

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Μεταλλαξιγένεση του γονιδίου *AMY2* στο φυτό
Lotus japonicus χρησιμοποιώντας ένα σύστημα
CRISPR/Cas9



Διπλωματική εργασία

Κουκάρα Ευγενία

Ιούνιος 2019

Τριμελής επιτροπή

Παπαδοπούλου Καλλιόπη [επιβλέπουσα]

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Φυτών

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος

Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

Γιακουντής Αντώνιος

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής

Εξώφυλλο: απεικόνιση του φυτού *Lotus japonicus*, της Δήμητρας Βασιλακοπούλου

Ευχαριστίες

Πρώτιστα, θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου την κ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη για την καθοδήγηση και τις συμβουλές που μου παρείχε, τις συζητήσεις που είχαμε στο πλαίσιο εκπόνησης της παρούσας εργασίας και φυσικά για το γεγονός ότι μου ανέθεσε εξ αρχής το συγκεκριμένο θέμα. Να τονιστεί ότι, εξαιτίας του μαθήματος ‘Βιοτεχνολογία Φυτών’ που δίδασκε και συνεχίζει να διδάσκει, συνειδητοποίησα το ενδιαφέρον μου για το συγκεκριμένο ερευνητικό τομέα.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να εκφράσω την τεράστια ευγνωμοσύνη μου στη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Τσιτσικλή Μαγδαληνή για την καθοδήγηση της κατά τη διάρκεια των πρώτων μου βημάτων στο εργαστήριο, για την πολύτιμη βοήθεια στα πειράματα και την ενθάρρυνση που μου έδωσε στις περιπτώσεις που κάτι δεν πήγε καλά (ήταν αρκετές). Ελπίζω στο μέλλον να υπάρξει η ευκαιρία να ξανασυνεργαστούμε.

Επίσης, στο σημείο αυτό χρωστάω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον μεταδιδάκτορα Γκαραγκούνη Κωνσταντίνο, διότι μέσα από το μάθημα της Συνθετικής Βιολογίας αντιλήφθηκα ότι στο μέλλον θέλω να ασχοληθώ με τον τομέα αυτό. Επιπλέον, είμαι ευγνώμων για την πολύτιμη βοήθεια που δέχτηκα κατά τη διάρκεια διεκπεραίωσης της συγκεκριμένης εργασίας.

Φυσικά, δε θα μπορούσα να παραλείψω τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος. Ο καθένας τους όχι μόνο πρόσθεσε τη δική του πινελιά στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, αλλά ταυτόχρονα δημιούργησε ένα ευχάριστο και δημιουργικό περιβάλλον εκπαίδευσης και εργασίας.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Καρούζα Δημήτριο, ο οποίος αρχικά με δέχτηκε στο εργαστήριο. Επιπροσθέτως, δεν ξεχνάω την πολύτιμη βοήθεια και γνώσεις που μου πρόσφεραν ο κ. Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος και ο κ. Γιακουντής Αντώνιος. Επίσης, τους ευχαριστώ, διότι δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Βασιλακοπούλου Δήμητρα για την υπέροχη απεικόνιση του φυτού *Lotus japonicus* στο εξώφυλλο της εργασίας και για το γεγονός ότι δεν κουράστηκε να ακούει τα παράπονα μου όλο αυτό τον καιρό.

Περιεχόμενα

Περίληψη	6
Abstract	7
Σκοπός εργασίας	8
Εισαγωγή	9
Α. Τριτερπένια	9
Β. Συνθάση της β-αμυρίνης στο φυτό <i>Lotus japonicus</i> : <i>AMY2</i>	11
Περιγραφή του γονιδίου <i>AMY2</i>	11
Το <i>AMY2</i> μέλος μιας συστοιχίας γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των τριτερπενίων	12
Μεταλλάγματα φυτών <i>Lotus japonicus</i> για το <i>AMY2</i>	14
Γ. Τεχνολογία CRISPR/Cas9	15
Προέλευση του συστήματος CRISPR/Cas9	15
Το σύστημα CRISPR/Cas9 ως εργαλείο επεξεργασίας γονιδιωμάτων	18
Δ. Τεχνολογία Gateway®	19
Αποτελέσματα	22
Α. Παραγωγή εξειδικευμένων sgRNAs	22
Σχεδιασμός των guide RNAs	22
Σύνθεση και εισαγωγή των guide RNAs σε πλασμιδιακό φορέα	29
Β. Έκφραση της <i>Cas9</i> υπό τον υποκινητή της ουβικουτίνης	30
Βελτίωση των παραμέτρων των αντιδράσεων ανασυνδυασμού BP και LR	30
Αντίδραση ανασυνδυασμού BP (attB x attP)	31
Αντίδραση ανασυνδυασμού LR (attL x attR)	37
Συζήτηση-Μελλοντικοί στόχοι	40
Υλικά και μέθοδοι	42
Σχεδιασμός των sgRNAs με τη βοήθεια του CRISPR-P 2.0	42
Παραγγελία των guide RNAs	43
Δημιουργία συγκεντρώσεων stock και working των guide RNAs	43
Υβριδοποίηση των συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων	44
Αντίδραση πέψης και σύνδεσης μορίων DNA σε ένα σωλήνα	44

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα <i>Escherichia coli</i>	46
Αντίδραση ανασυνδυασμού BP	48
Αντίδραση ανασυνδυασμού LR	50
Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων <i>E. coli</i> με πλασμιδιακό DNA	52
Επαλήθευση αποικιών με τη μέθοδο της PCR	53
Επαλήθευση αποικιών με τη μέθοδο της colony PCR	55
Πέψη πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού	56
Ανάλυση τμημάτων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	57
Παρασκευή θρεπτικού υλικού για την ανάπτυξη βακτηρίων	58
Χρήση αντιβιοτικών για την επιλογή βακτηρίων με το επιθυμητό πλασμίδιο	59
Αποθήκευση βακτηρίων σε γλυκερόλη για μεγάλα χρονικά διαστήματα	59
Παράρτημα	61
Α. Χάρτες πλασμιδιακών φορέων	61
Β. Χάρτες ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων	63
Βιβλιογραφία	64

Περίληψη

Τα τριτερπένια αποτελούν μια πολυπληθή και ετερογενή οικογένεια δευτερογενών μεταβολιτών που εμπλέκονται σε καίριες διεργασίες κατά την ανάπτυξη του φυτού. Μια τέτοια διεργασία είναι η φυματογένεση, χαρακτηριστικό των ψυχανθών. Η έρευνα της βιοσύνθεσης των τριτερπενίων και του ρόλου τους στο μοντέλο ψυχανθές *Lotus japonicus* οδήγησε στον χαρακτηρισμό του γονιδίου *AMY2* που κωδικοποιεί μια κυκλάση οξειδοσκουαλένιου μικτής δράσης. Η αποσαφήνιση του ρόλου του μπορεί να γίνει μέσω της στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης του χρησιμοποιώντας την τεχνολογία CRISPR/Cas9. Η επιτυχία της αποσιώπησης καθορίζεται από το σωστό σχεδιασμό του συστήματος. Επομένως, ο πρώτος στόχος της εργασίας ήταν ο σχεδιασμός εξειδικευμένων guide RNAs και η εισαγωγή τους σε πλασμιδιακό φορέα που φέρει το gRNA scaffold και τον υποκινητή U6 του *L. japonicus*. Ο δεύτερος στόχος ήταν η αντικατάσταση του υποκινητή CaMV 35S με τον υποκινητή της ουβικουΐνης (pUB500i) χρησιμοποιώντας την τεχνολογία Gateway®, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η επαρκής έκφρασης της Cas9. Η λειτουργικότητα των παραπάνω κατασκευών θα ελεγχθεί μέσω της μεθόδου μετασχηματισμού Hairy Root. Απώτερος σκοπός είναι η δημιουργία σταθερής σειράς *L. japonicus* μεταλλαγμένης για το *AMY2*.

Abstract

Triterpenes form a diverse and heterogeneous family of secondary metabolites involved in crucial processes during plant development. The formation of nodules, a characteristic trait of legumes, is such a process. The study of triterpene biosynthesis and its role in *Lotus japonicus* legume model disclosed the novel gene *AMY2* encoding a multifunctional oxidosqualene cyclase. Although details of its expression pattern and putative involvement in nodule formation have been described, there are still many aspects of the function of *AMY2* that remain unknown. Clarification of its role can be done through its targeted mutagenesis using CRISPR/Cas9 technology. The success of silencing is determined by the correct design of the system. Therefore, the first objective of this work was to design specialized guide RNAs and introduce them into a plasmid vector carrying the gRNA scaffold and the *L. japonicus* U6 promoter. The second objective was to replace the CaMV 35S promoter with the ubiquitin promoter (pUB500i) using Gateway® technology to ensure adequate expression of Cas9. The functionality of the above structures will be verified by Hairy Root transformation. The ultimate goal is to create a stable *L. japonicus* line mutated for *AMY2*.

Σκοπός διπλωματικής εργασίας

Το γονίδιο *AMY2* κωδικοποιεί μια κυκλάση οξειδοσκουαλένιου μικτής δράσης στο φυτό *Lotus japonicus*. Τα προϊόντα της, εκ των οποίων η β-αμυρίνη, φαίνεται ότι εμπλέκονται σε σημαντικές διαδικασίες κατά την ανάπτυξη του φυτού, όπως η φυματιογένεση. Αν και το γονίδιο έχει ήδη περιγραφεί, υπάρχουν ακόμη άγνωστες πτυχές σχετικά με το ρόλο και τους μεταβολίτες του. Για τον πλήρη χαρακτηρισμό του γονιδίου *AMY2* στο φυτό *L. japonicus* είναι απαραίτητη η δημιουργία ενός σταθερού μεταλλάγματος. Η μεταλλαξιγένεση του *AMY2* μέσω της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 προϋποθέτει δύο συνιστώσες: την παραγωγή εξειδικευμένων sgRNAs και την επαρκή έκφραση της Cas9. Ο πρώτος στόχος περιλαμβάνει το σχεδιασμό guide RNAs που στοχεύουν το *AMY2*. Το κάθε guide RNA θα εισαχθεί σε πλασμιδιακό φορέα που φέρει τον υποκινητή U6 του *L. japonicus* και το gRNA scaffold. Για την επίτευξη του δεύτερου στόχου χρειάζεται η αντικατάσταση του υποκινητή CaMV 35S με τον υποκινητή της ουβικουΐνης (pUB500i) χρησιμοποιώντας την τεχνολογία Gateway®. Στο μέλλον, αφού ελεγχθεί η δραστηριότητα του συστήματος μέσω παροδικής έκφρασης στις ρίζες του φυτού, το εργαστήριο μας θα προχωρήσει στη δημιουργία σταθερής σειράς *L. japonicus* μεταλλαγμένης για το *AMY2*.

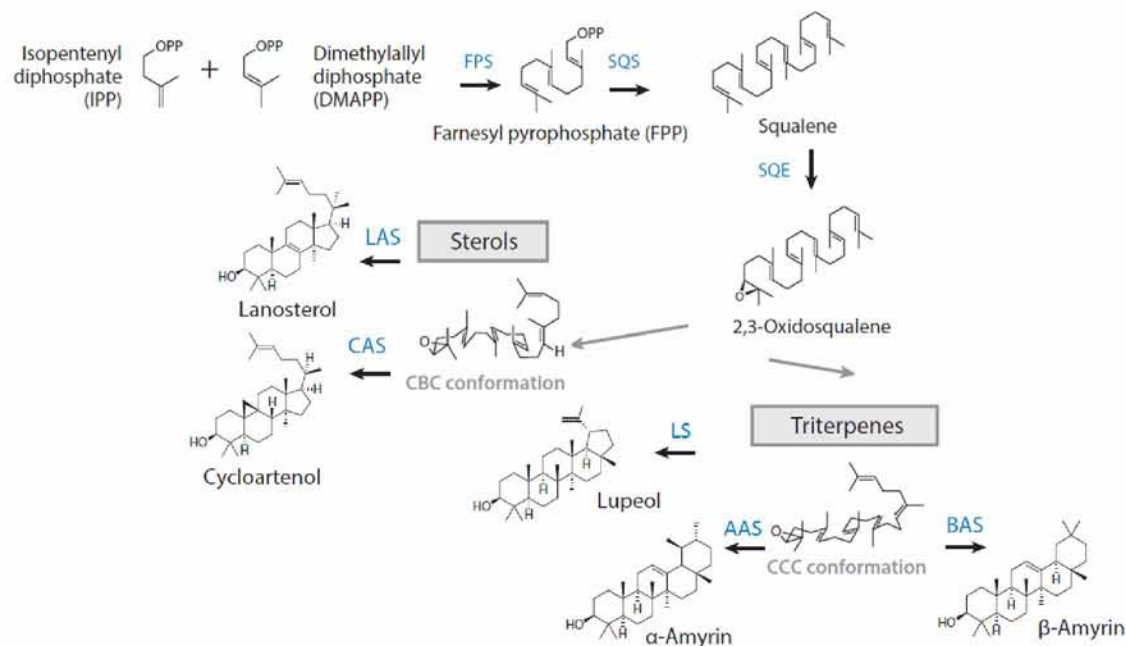
Εισαγωγή

Α. Τριτερπένια

Τα τριτερπένια, ενώσεις που αποτελούνται από έξι μονάδες ισοπρενίου των πέντε ατόμων άνθρακα, συνθέτουν μια πολυπληθή ομάδα φυσικών προϊόντων με χαρακτηριστικό τη δομική ετερογένεια (Hill and Connolly 2018). Ανήκουν στην οικογένεια των τερπενίων, ενώσεις του δευτερογενούς μεταβολισμού των φυτών (Xu, Fazio, and Matsuda 2004). Ως δευτερογενείς μεταβολίτες δε θεωρούνται άμεσα απαραίτητα για τη φυσιολογική ανάπτυξη του φυτού (Bennett et al. 1994). Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει ότι εμπλέκονται σε διαδικασίες σημαντικές για την επιβίωση και ευημερία του φυτού. Για παράδειγμα, ορισμένα γλυκοζυλιωμένα τριτερπένια, μια τροποποιημένη μορφή των τριτερπενίων, έχουν αντιμικροβιακή δράση και ίσως δρουν ως ένα είδος άμυνας προστατεύοντας το φυτό από επίθεση παθογόνων παραγόντων (Papadopoulou et al. 1999). Επιπλέον, από εργασίες της τελευταίας δεκαετίας φαίνεται ότι ορισμένα τριτερπένια εμπλέκονται σε κρίσιμες διαδικασίες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της οργανογένεσης: η λουπεόλη (lupeol) στη φυματογένεση (Delis et al. 2011) και η β-αμυρίνη (β-amyrin) στη φυματογένεση (Confalonieri et al. 2009) και στην ανάπτυξη της ρίζας (Kemen et al. 2014). Επιπλέον, αξίζει να τονιστεί ότι οι ουσίες αυτές εκτός από επιστημονικό ενδιαφέρον έχουν και βιομηχανικό, καθώς υπάρχουν αρκετά παραδείγματα βιομηχανικής τους χρήσης (Laszczyk 2009), (Moses et al. 2013). Γίνεται, λοιπόν, ξεκάθαρο πως υπάρχουν ακόμα πολλές άγνωστες πτυχές του ρόλου των τριτερπενίων και δικαιολογημένα πολλά εργαστήρια ανά τον κόσμο ασχολούνται με τα μόρια αυτά.

Ένα μεγάλο κομμάτι της μελέτης αυτής σχετίζεται με τη βιοσύνθεση τους. Η κυκλοποίηση του 2,3-οξειδοσκουαλένιου σε τριτερπένια ή στερόλες αποτελεί μια από τις πιο περίπλοκες ενζυμικές αντιδράσεις που συναντάει κανείς στο μεταβολισμό των τερπενίων (Phillips et al. 2006), (Wendt 2005). Η φύση της συγκεκριμένης κυκλοποίησης απασχολεί τους οργανικούς χημικούς και βιοχημικούς για πολλές δεκαετίες (Eschenmoser and Arigoni 2005). Η διάκριση μεταξύ τριτερπενίων και στερολών βασίζεται στον τρόπο με τον οποίο συντίθενται τα μόρια αυτά από τις κυκλάσες του οξειδοσκουαλένιου (oxidosqualene cyclases ή OSCs) (Εικόνα 1). Τα ένζυμα αυτά χαρακτηρίζονται ως ένζυμα ‘ταυτότητα’ (signature enzymes) (Iturbe-Ormaetxe et al. 2003). Στη βιοσύνθεση των βασικότερων τριτερπενίων, το 2,3-οξειδοσκουαλένιο κυκλοποιείται προς β-αμυρίνη, α-αμυρίνη και λουπεόλη από τις συνθάσες της β-αμυρίνης, της α-αμυρίνης και της λουπεόλης μέσω της διαμόρφωσης καρέκλας-καρέκλας-καρέκλας (chair-chair-chair ή CCC).

Αντίθετα στη βιοσύνθεση των στερολών, το 2,3-οξειδοσκουαλένιο κυκλοποιείται προς λανοστερόλη και κυκλοαρτενόλη από τις συνθάσες της κυκλοαρτενόλης και της λανοστερόλης μέσω της διαμόρφωσης καρέκλας-βάρκας-καρέκλας (chair-boat-chair ή CBC) (Xu et al. 2004).



Εικόνα 1. Βιοσυνθετική πορεία τριτερπενίων και στερολών

Τα μόρια αυτά συντίθενται από μόρια του μονοπατιού του μεβαλονικού οξέος. Με γαλάζιο σημειώνονται τα ένζυμα. FPS: συνθάση του διφωφορικού φαρνεσυλίου, SQS: συνθάση του σκουαλένιου, SQE: μονοοξυγενάση του σκουαλένιου, LAS: συνθάση της λανοστερόλης, CAS: συνθάση της κυκλοαρτενόλης, LS: συνθάσης της λουπεόλης, AAS: συνθάση της α-αμυρίνης, BAS: συνθάση της β-αμυρίνης. Προσαρμόστηκε από (Thimmappa et al. 2014).

Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής βήματα: 1) δέσμευση και αναδίπλωση του υποστρώματος, 2) έναρξη της αντίδρασης μέσω πρωτονίωσης του εποξειδίου, 3) κυκλοποίηση και αναδιάταξη των κατιόντων και 4) τερματισμός της αντίδρασης με αποπρωτονίωση ή σύλληψη νερού για να παραχθεί ένα τελικό προϊόν τερπενίου. Το πρώτο βήμα της αναδίπλωσης του 2,3-οξειδοσκουαλένιου είναι κρίσιμο, διότι αυτό προδιαθέτει το υπόστρωμα να ακολουθήσει μια συγκεκριμένη οδό κυκλοποίησης. Οι διαμορφώσεις CCC και CBC οδηγούν στον σχηματισμό διαφορετικών κατιόντων, τα οποία στη συνέχεια δημιουργούν ένα πλήθος ποικίλων ικριωμάτων (Abe 2007). Μεταγενέστερες τροποποιήσεις των ικριωμάτων τριτερπενίου από τροποποιητικά ένζυμα ή αλλιώς 'tailoring' ένζυμα, όπως ένζυμα του κυτοχρώματος P450, ακετυλοτρανσφεράσες, γλυκοζυλοτρανσφεράσες και μεθυλοτρανσφεράσες, οδηγούν στην τεράστια δομική ποικιλότητα της ομάδας αυτής (Osbourne 2010).

B. Συνθάση της β-αμυρίνης στο φυτό *Lotus japonicus*: *AMY2*

Περιγραφή του γονιδίου *AMY2*

Στην αρχή της εισαγωγής έγινε αναφορά σε ένα συγκεκριμένο τριτερπένιο, τη β-αμυρίνη και στο ρόλο που διαδραματίζει στη φυτική ανάπτυξη (Kemen et al. 2014) και τη φυματογένεση (Confalonieri et al. 2009). Έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η μελέτη της βιοσύνθεσης της β-αμυρίνης και των υπόλοιπων τριτερπενίων στα ψυχανθή (*Fabales* ή *Leguminosae*), διότι κύριο χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης οικογένειας φυτών είναι η συμβίωση του φυτού-ξενιστή με το βακτηριακό γένος *Rhizobium*, η οποία προκαλεί τον σχηματισμό των ριζικών φυματίων (Udvardi and Day 2002). Η μελέτη και εξακρίβωση της λειτουργίας της β-αμυρίνης απασχολεί πολλά εργαστήρια, συμπεριλαμβανομένου και του δικού μας (Haralampidis et al. 2001; Husselstein-Muller, Schaller, and Benveniste 2001; Morita et al. 2000). Η κλωνοποίηση της αλληλουχίας γονιδίων που κωδικοποιούν συνθάσες της β-αμυρίνης σε πλασμιδιακούς φορείς με στόχο τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτικών σειρών αποτελεί ένα ιδανικό εργαλείο για τη διερεύνηση των μονοπατιών στα οποία εμπλέκεται η β-αμυρίνη (Haralampidis, Trojanowska, and Osbourn 2002).



Εικόνα 2. Το φυτό *Lotus japonicus*

Έχει επιλεγθεί ως μοντέλο ψυχανθές λόγω του μικρού σχετικά διπλοειδούς γονιδιώματος (472 Mb), της ικανότητας αυτογονιμοποίησης και του μικρού κύκλου ζωής (2-3 μήνες) (Sato et al. 2008).

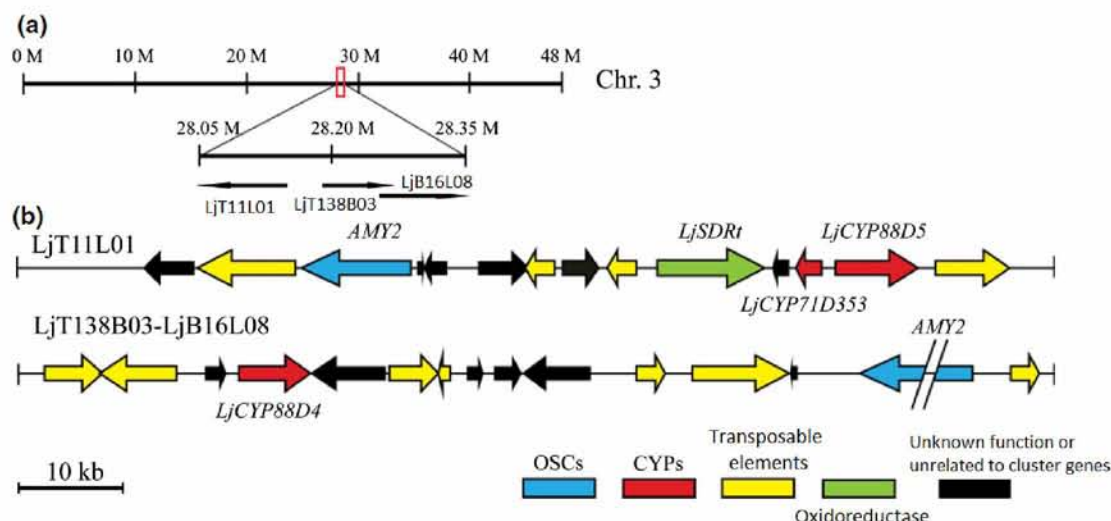
Η μεθοδολογία αυτή χρησιμοποιήθηκε από μέλη του εργαστηρίου μας, σε συνεργασία με άλλα εργαστήρια, για την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό τέτοιων γονιδίων στα μοντέλα ψυχανθή *Medicago truncatula* και *Lotus japonicus* (Iturbe-Ormaetxe et al. 2003). Σχετικά με το φυτό *Lotus japonicus*, ακολούθησαν την εξής πορεία: 1) απομόνωση ολικού RNA από τη ρίζα, 2) σχεδιασμός εκκινητών που υβριδίζονται σε συντηρημένες περιοχές χαρακτηρισμένων συνθάσεων της β-αμυρίνης άλλων φυτικών ειδών, 3) ενίσχυση των επιθυμητών cDNA αλληλουχιών και 4) εν τέλει ταυτοποίηση δύο ds-cDNA αλληλουχιών, εκ των οποίων η μία ονομάστηκε *LjAMY2*. Έπειτα από πειράματα ετερόλογης έκφρασης στη ζύμη βρέθηκε ότι το γονίδιο *LjAMY2* κωδικοποιεί μια

συνθάση μικτής δράσης καταλύοντας τη σύνθεση δύο τριτερπενίων, της β-αμυρίνης και της λουπεόλης. Με βάση αυτή την πληροφορία φαίνεται ότι η συνθάση LjAMY2 είναι το μόνο ένζυμο που έχει περιγραφεί μέχρι σήμερα που συνθέτει λουπεόλη και β-αμυρίνη ως τα δύο κύρια προϊόντα. Πειράματα μελέτης του προτύπου έκφρασης του γονιδίου έδειξαν ότι εκφράζεται στη ρίζα του φυτού (Iturbe-Ormaetxe et al. 2003).

Περαιτέρω πειράματα επιβεβαίωσαν την έκφραση του γονιδίου του LjAMY2, το οποίο ονομάστηκε OSC8 ή απλώς AMY2 (Sawai et al. 2006). Σε αντίθεση με τα ευρήματα της προηγούμενης εργασίας, τα πειράματα της ομάδας του Sawai έδειξαν ότι η έκφραση του γονιδίου επεκτείνεται και στα φυμάτια του φυτού *L. japonicus* (Sawai et al. 2006).

Το AMY2 μέλος μιας συστοιχίας γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των τριτερπενίων

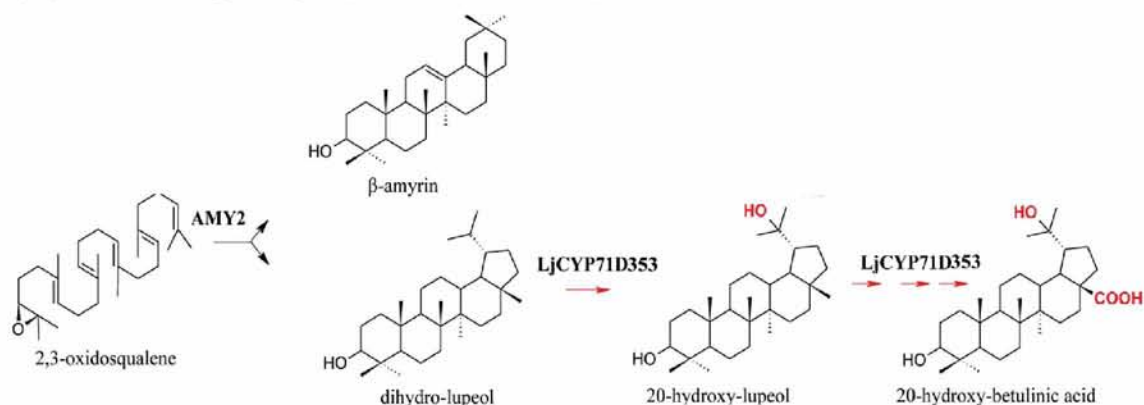
Όπως έχει ήδη αναφερθεί το AMY2 κωδικοποιεί μια συνθάση τριτερπενίων μικτής δράσης (Iturbe-Ormaetxe et al. 2003). Έχει παρατηρηθεί πως τα γονίδια που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των τριτερπενίων δημιουργούν συστοιχίες γονιδίων (gene clusters) (Qi et al. 2004), (Osbourne 2010). Επομένως, με βάση αυτή την παρατήρηση, το εργαστήριο μας προχώρησε σε *in silico* ανάλυση για την εύρεση γονιδίων εκατέρωθεν του AMY2 που να συμμετέχουν στον δευτερογενή μεταβολισμό των τριτερπενίων (Krokida et al. 2013). Με τη μέθοδο αυτή ταυτοποιήθηκαν δύο συστοιχίες γονιδίων, οι οποίες χαρτογραφούνται στο χρωμόσωμα 3 (Εικόνα 3). Στη μια συστοιχία, το AMY2 συνυπάρχει με άλλα γονίδια του μεταβολισμού που κωδικοποιούν τροποποιητικά ένζυμα των τριτερπενίων. Τα γονίδια της συστοιχίας συνεκφράζονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της ρίζας και των φυματίων, κάτω από βιοτικές και αβιοτικές συνθήκες (Krokida et al. 2013).



Εικόνα 3. Οργάνωση συστοιχιών γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό των τριτερπενίων

Ο γενωμικός κλώνος LjT11L01 αποκάλυψε τη συστοιχία του AMY2 που αποτελείται από το AMY2 που κωδικοποιεί τη συνθάση μικτής δράσης, τα *LjCYP88D5* και *LjCYP71D353* που προβλέπεται ότι κωδικοποιούν τροποποιητικά ένζυμα του κυτοχρώματος P450 και το *LjSDRt* που προβλέπεται ότι κωδικοποιεί μια αναγωγή. Οι δύο συνεχείς κλώνοι LjT138B03 και LjB16L08 αποκάλυψαν μια δεύτερη συστοιχία του ψευδογονιδίου AMY2-like, που φέρει τεράστια ομοιότητα με το AMY2, και το *LjCYP88D*.

Πειράματα ετερόλογης έκφρασης του AMY2 σε φύλλα καπνού *Nicotiana benthamiana* αποκάλυψαν την ύπαρξη της β-αμυρίνης και ενός άλλου μορίου, της διϋδρολουπεόλης (dihydrolypeol). Αντίθετα η λουπεόλη δεν ανιχνεύτηκε. Μάλιστα όταν συνεκφράστηκε το AMY2 με το *LjCYP71D353* ανιχνεύτηκε ένα διαφορετικό προϊόν, το 20-υδροξυ-βητουλινικό οξύ (20-hydroxybetulinic acid). Ωστόσο, δεν είναι ακόμη σίγουρο εάν η σύνθεση της διϋδρολουπεόλης προέρχεται εξ ολοκλήρου από τη δράση της συνθάσης της β-αμυρίνης ή από συνεργειακή δράση της συνθάσης με κάποιο ενδογενές ένζυμο του καπνού ή ακόμη και εάν αυτή είναι η πραγματική δομή του μορίου που ανιχνεύτηκε (Krokida et al. 2013).



Εικόνα 4. Προτεινόμενες ενζυματικές αντιδράσεις των δύο γονιδίων της συστοιχίας του AMY2

Όσον αφορά τον ρόλο του *AMY2*, σε διαγονιδιακές ρίζες *L. japonicus*, στις οποίες είχε γίνει στοχευμένη σίγηση του *AMY2* μέσω RNA-φουρκέτας, δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση στον αριθμό των φυματίων, αν και είχε παρατηρηθεί ότι η λουπεόλη ρυθμίζει αρνητικά τη φυματιογένεση (Delis et al. 2011). Επιπλέον, σταθερά μεταλλαγμένες σειρές φυτών *L. japonicus*, στις οποίες είχε σιγηθεί το *AMY2* μέσω RNA-φουρκέτας, δεν άνθιζαν και εμφάνιζαν σταθερά μια κοντή και υποανάπτυκτη ρίζα (Krokida et al. 2013). Συμπεραίνεται, λοιπόν, ότι υπάρχουν ακόμη πολλά αναπάντητα ερωτήματα γύρω από το ρόλο του *AMY2* και τους συντιθέμενους μεταβολίτες του.

Μεταλλάγματα φυτών *Lotus japonicus* για το *AMY2*

Για την περαιτέρω ανάλυση του γονιδίου *AMY2* και την πλήρη εξακρίβωση του ρόλου που έχει στην ανάπτυξη του φυτού και τη φυματιογένεση χρειαζόμαστε σταθερές μεταλλαγμένες σειρές φυτών *L. japonicus*, στις οποίες είτε να μην παράγεται καθόλου το ένζυμο (knockout φυτά), είτε να παράγεται σε χαμηλότερα επίπεδα (knockdown φυτά). Μια κατηγορία μεταλλαγμάτων είναι η συλλογή γενετικού φυτικού υλικού LORE1. Βασίζεται στην ένθεση του *Lotus retrotransposon 1* (LORE1) που είναι ένα φυσικό ρετροτρανσποζόνιο τύπου LTR (long terminal repeat) του φυτού (Fukai, Stougaard, and Hayashi 2013) στο γονιδίωμα του *L. Japonicus* GIFU. Υπάρχουν αρκετές σειρές στις οποίες έχει ανιχνευτεί η ένθεση του τρανσποζονίου σε διάφορες θέσεις του *AMY2* (Małolepszy et al. 2016). Ωστόσο, το συγκεκριμένο είδος μεταλλάγματος δεν είναι σταθερό, λόγω του μηχανισμού αντιγραφής του ρετροτρανσποζονίου (copy-and-paste) (Schulman 2013). Η συνεχής μετάθεση του σε νέες θέσεις επηρεάζει την έκφραση και άλλων γονιδίων, επομένως δεν μπορούν να βγουν ασφαλή συμπεράσματα για τη λειτουργία του *AMY2*. Ο περιορισμός αυτός αφορά μόνο τα ετερόζυγα μεταλλάγματα. Από την άλλη πλευρά, δεν έχει απομονωθεί ως τώρα κάποιο ομόζυγο μετάλλαγμα πρώτης γενιάς. Προφανώς, ο συγκεκριμένος φαινότυπος δεν είναι επιβιώσιμος, αν και ακόμα δεν γνωρίζουμε περαιτέρω πληροφορίες (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα).

Υπάρχει ακόμη ένα είδος μεταλλάγματος, το μετάλλαγμα tilling (tilling mutant) του *AMY2*. Πρόκειται για μετάλλαξη μιας βάσης (από γουανίνη σε αδενίνη) που προκαλεί πρόωρο κωδικόνιο λήξης. Δημιουργήθηκε μέσω έκθεσης στο χημικό μεταλλαξιγόνο EMS (ethyl methanesulfonate). Συνεργάτες του εργαστηρίου απομόνωσαν και χαρακτήρισαν ομόζυγα φυτά μεταλλαγμένα για το

AMY2. Σε αντίθεση με τα ομόζυγα *LORE1*, αυτό το είδος μεταλλάγματος είναι βιώσιμο, μεγαλώνει κανονικά και αναπαράγεται (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα).

Επειδή, λοιπόν, παρατηρείται αυτή η αντίθεση, αλλά και για τους λόγους που ήδη αναφέρθηκαν, είναι αναγκαίο να δημιουργηθεί ένα νέο σταθερό μετάλλαγμα του φυτού *L. japonicus* στο οποίο θα έχει αποσιωπηθεί το γονίδιο *AMY2*. Η μεταλλαξιγένεση θα προκληθεί χρησιμοποιώντας την τεχνολογία CRISPR/Cas9.

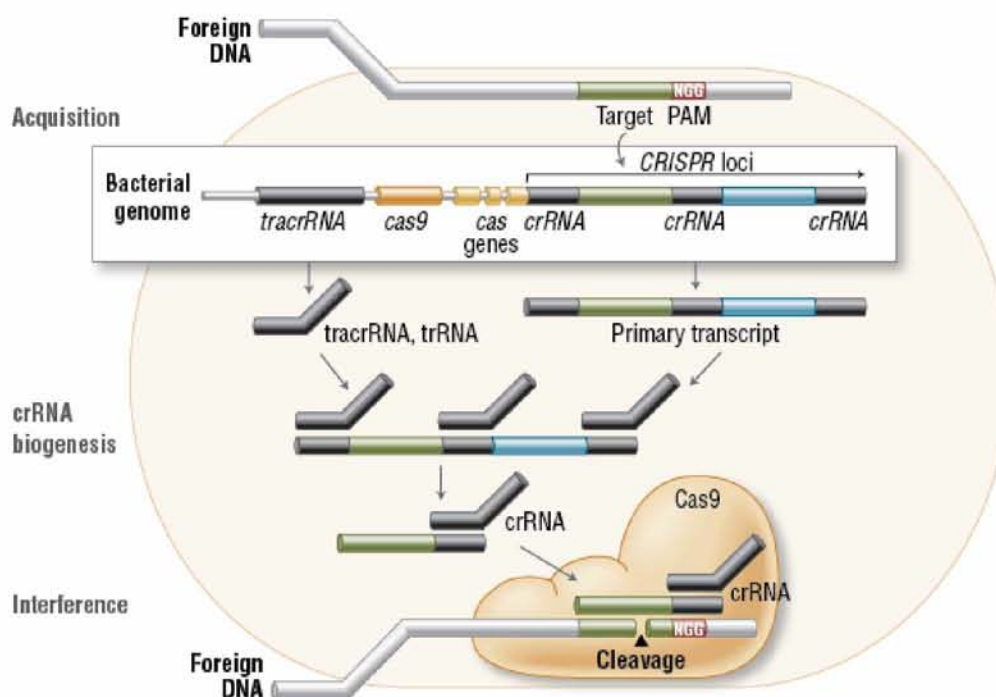
Γ. Τεχνολογία CRISPR/Cas9

Προέλευση του συστήματος CRISPR/Cas9

Η τεχνολογία CRISPR/Cas είναι βασισμένη στην ύπαρξη ενός φυσικού μηχανισμού προσαρμοστικής άμυνας των βακτηρίων και των αρχαίων, ο οποίος τα προστατεύει από την εισβολή νουκλεϊκών οξέων διασπώντας το ξένο DNA (Bhaya, Davison, and Barrangou 2011). Η ανακάλυψη του ξεκίνησε με την τυχαία εύρεση ενός τμήματος της περιοχής CRISPR που αποτελούνταν από επαναλαμβανόμενες επαναλήψεις των είκοσι εννέα νουκλεοτιδίων και διακόπτονταν από αλληλουχίες των τριάντα δύο νουκλεοτιδίων στο βακτήριο *Escherichia coli* (Ishino et al. 1987). Το μοτίβο αυτό αργότερα ονομάστηκε CRISPR, δηλαδή Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats. Ο όρος περιγράφει μια συστοιχία βραχέων παλινδρομικών επαναλήψεων, οι οποίες διακόπτονται τακτικά από μη επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που αποκαλούνται “spacers” (Jansen et al. 2002). Αργότερα, ανακαλύφθηκε πως οι μη επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες είναι ιικής ή και πλασμιδιακής προέλευσης (Bolotin et al. 2005; Mojica et al. 2005; Pourcel, Salvignol and Vergnaud 2005). Κάθε συστοιχία CRISPR πλαισιώνεται και από ένα σύμπλεγμα γονιδίων, τα γονίδια Cas (CRISPR-associated proteins), δηλαδή γονίδια των οποίων οι πρωτεΐνες σχετίζονται με τη συστοιχία CRISPR (Jinek et al. 2012).

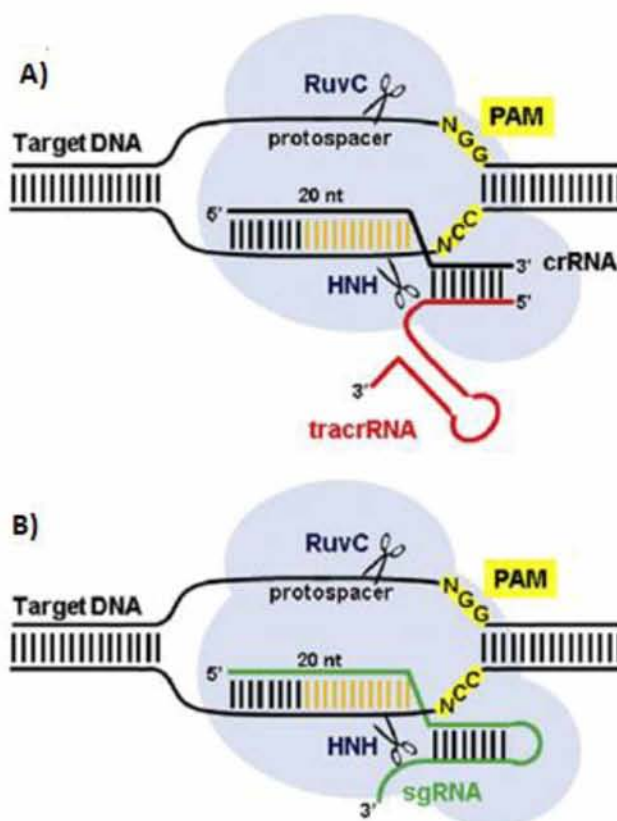
Κάθε φυσικό προκαρυωτικό σύστημα CRISPR/Cas αποτελείται από α) ένα σύμπλεγμα γονιδίων Cas που κωδικοποιούν ενδονουκλεάσες κατευθυνόμενες από RNA, β) μια συστοιχία CRISPR, η οποία αποτελείται από ταυτόσημες παλίνδρομες επαναλήψεις που διακόπτονται από τις αλληλουχίες “spacers”. Κάθε αλληλουχία “spacer” δημιουργείται από την ένθεση ενός βραχέου θραύσματος νουκλεϊκού οξέος που προέρχεται από το γονιδίωμα του εισβολέα (Makarova et al. 2017). Οι αλληλουχίες “spacers” χρησιμοποιούνται ως στοιχεία μνήμης από το κύτταρο. Κωδικοποιούν βραχέα μη κωδικά RNAs που κατευθύνουν την ενδονουκλεάση Cas στην ομόλογη περιοχή του εισβάλλοντος DNA με το οποίο είχαν μολυνθεί στο παρελθόν και το καταστρέφουν. Για το λόγο αυτό το σύστημα θεωρείται ως ένας μηχανισμός επίκτητης άμυνας (Barrangou et al. 2007).

Έπειτα από την αρχική ανακάλυψη του συστήματος έχουν πλέον χαρακτηριστεί και άλλα συστήματα CRISPR/Cas σε διάφορους μικροοργανισμούς και έχουν κατηγοριοποιηθεί σε δύο κλάσεις (Class 1-2) και τρεις τύπους (Type I-III) (Makarova et al. 2011). Το σύστημα CRISPR/Cas9 τύπου II, το οποίο προέρχεται από το βακτήριο *Streptococcus pyogenes*, είναι αυτό που έχει μελετηθεί εκτενώς (Εικόνα 5). Ο αμυντικός μηχανισμός του συστήματος διακρίνεται σε τρία στάδια: 1) φάση απόκτησης (acquisition phase), 2) φάση έκφρασης (expression phase) και 3) φάση παρεμβολής (interference phase) (Al-Attar et al. 2011). Η πρώτη φάση περιλαμβάνει την ενσωμάτωση νέων αλληλουχιών “spacers” στο εγγύς άκρο της συστοιχίας CRISPR κατά χρονολογική σειρά (Swarts et al. 2012). Στη δεύτερη φάση, εκφράζονται τα γονίδια Cas, το πρόδρομο CRISPR-RNA ή προ-crRNA (precursor CRISPR-RNA ή pre-crRNA) και το tracr-RNA (trans-activating CRISPR-RNA). Το προ-crRNA ωριμάζει σε crRNA με τη βοήθεια του tracr-RNA και άλλων παραγόντων. Τέλος, στη φάση παρεμβολής, με τη συνδυαστική δράση της ενδονουκλεάσης Cas, του crRNA και του tracr-RNA, η ομόλογη ακολουθία-στόχος στο εισβάλλον DNA αναγνωρίζεται και κόβεται μέσω της δημιουργίας μιας θραύσης διπλής έλικας (Sontheimer and Marraffini 2010). Βασική προϋπόθεση για την κοπή του εισβάλλοντος γονιδιώματος είναι η παρουσία ενός μοτίβου καθοδικά της ακολουθίας “protospacer”, της αλληλουχίας PAM (Protospacer-Adjacent-Motif, δηλαδή μοτίβο γειτονικά του “protospacer”) (Εικόνα 6.A). Στην περίπτωση της Cas9 η αλληλουχία PAM αποτελείται από το τρινουκλεοτίδιο 5’ NGG3’, με N οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο (Gasiunas et al. 2012). Μπορεί, ωστόσο, να αναγνωρίσει και το 5’ NAG3’ (Hsu et al. 2013).



Εικόνα 5. Τα στάδια του αμυντικού μηχανισμού του συστήματος CRISPR/Cas9

Φάση απόκτησης του “spacer”, φάση έκφρασης του *crRNA* και φάση παρεμβολής. Το σχήμα προέρχεται από την ιστοσελίδα www.neb.com.



Εικόνα 6. Μηχανισμός διάσπασης της διπλής έλικας του DNA ανοδικά της αλληλουχίας PAM

A) Η Cas9 (γαλάζιο) οδηγείται στο στόχο από μια δομή που δημιουργούν το crRNA και το tracrRNA. Η διπλή έλικα ανοίγει και το crRNA υβριδίζεται με τη συμπληρωματική αλυσίδα του protospacer. Ιδιαίτερα σημαντική για την αναγνώριση και υβριδοποίηση θεωρείται η ακολουθία των 12 νουκλεοτιδίων που φαίνονται με πορτοκαλί. Η ύπαρξη της PAM καθοδικά του protospacer αποτελεί προϋπόθεση για τη διάσπαση του DNA. Η Cas9 αποτελείται από τις καταλυτικές μονάδες RuvC και HNH. Η RuvC κόβει στην περιοχή του protospacer τρία νουκλεοτίδια ανοδικά της PAM, ενώ η HNH στη συμπληρωματική της. B) Το σύστημα μπορεί να απλοποιηθεί με τη χρήση του χμαιορικού μορίου sgRNA, που αποτελείται από το crRNA και το tracrRNA στο 5' και 3' άκρο αντίστοιχα (Bortesi and Fischer 2015).

Το σύστημα CRISPR/Cas9 ως εργαλείο επεξεργασίας γονιδιωμάτων

Μέχρι πρόσφατα, τα κυριότερα εργαλεία επεξεργασίας του γονιδιώματος ήταν οι νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου [zinc fingers nucleases ή ZFNs (Kim, Cha, and Chandrasegaran 1996)] και οι νουκλεάσες-τελεστές που μοιάζουν με μεταγραφικούς παράγοντες [transcription activator-like effector nucleases ή TALENs (Christian et al. 2010)]. Πρόκειται για τεχνητές χμαιορικές πρωτεΐνες που αποτελούνται από μια υπομονάδα πρόσδεσης του DNA συγχωνευμένη με την υπομονάδα μη ειδικής νουκλεάσης της ενδονουκλεάσης FokI. Πλέον χρησιμοποιούνται τα συστήματα CRISPR/Cas και κατά κόρον το CRISPR/Cas9. Η μετάβαση από ένα φυσικό σύστημα άμυνας σε ένα εργαλείο επιστημονικής έρευνας έγινε όταν αποδείχθηκε πως αλλάζοντας απλά την αλληλουχία του crRNA μπορεί να επαναπρογραμματιστεί και η αλληλουχία-στόχος. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να συνδυαστεί η εξειδίκευση στόχου του crRNA (guide RNA) με τις υποστηρικτικές ιδιότητες του tracrRNA (gRNA scaffold) σε ένα χμαιορικό μόριο RNA, το αποκαλούμενο single guide RNA ή sgRNA (Εικόνα 6.B) (Jinek et al. 2012). Όσον αφορά το γονίδιο της Cas9, γίνονται αλλαγές στα κωδικόνια με βάση αυτά που επιλέγονται με μεγαλύτερη συχνότητα από τη μεταφραστική μηχανή του οργανισμού (codon optimization). Στην περίπτωση του *Lotus japonicus* έχει βρεθεί ότι η hCas9 (human codon optimized) εκφράζεται σε ικανοποιητικά επίπεδα (Zhang et al. 2016).

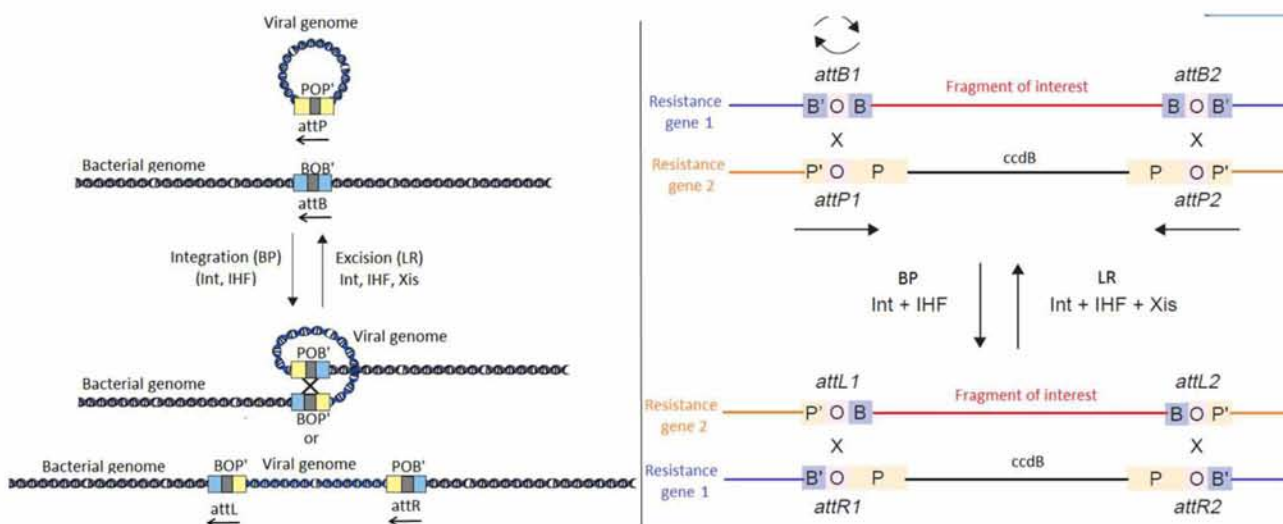
Η λογική του συστήματος περιλαμβάνει την πρόκληση ρήξεων στη δίκλωνη αλυσίδα του DNA. Η θραύση, στη συνέχεια, μπορεί να επιδιορθωθεί μέσω δύο ενδοκυτταρικών μηχανισμών, είτε με μη ομόλογη σύνδεση άκρων (non homologous end-joining, NHEJ) είτε μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (homology directed repair, HDR). Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης NHEJ είναι ο κυρίαρχος. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία μεταλλάξεων υπό μορφή ενθεμάτων ή/και ελλειμμάτων που προκαλούν την μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης στο γονίδιο-στόχο και έτσι την αδυναμία έκφρασης της πρωτεΐνης (Zhang, Wen, and Guo 2014).

Ένα βασικό μειονέκτημα της τεχνολογίας αυτής είναι η μη ειδική στόχευση (off-target effects). Ο σχεδιασμός του crRNA βασίζεται στην ύπαρξη της αλληλουχίας PAM. Ωστόσο, εάν η αλληλουχία-στόχος και η PAM αναγνωρίζονται και σε άλλες περιοχές του γονιδιώματος, ακόμη και με κάποιες αναντιστοιχίες, είναι δυνατόν να κοπούν. Για την αποφυγή της ανεξέλεκτης διάσπασης του γονιδιώματος έχουν σχεδιαστεί διάφορα εργαλεία σχεδιασμού των crRNAs και πρόβλεψης της μη ειδικής στόχευσης (Zhang et al. 2015).

Συνεπώς, στην παρούσα εργασία, για να επιτευχθεί η μεταλλαξιγένεση του *AMY2* μέσω ενός συστήματος CRISPR/Cas9 χρειάζονται δύο στοιχεία: η ενδονουκλεάση Cas9 και το κατάλληλα σχεδιασμένο sgRNA. Ο σχεδιασμός της ακολουθίας του crRNA έγινε με εργαλεία βιοπληροφορικής. Στη συνέχεια, ενσωματώθηκε με τη μορφή δίκλωνου μορίου σε φορέα που ήδη φέρει το tracrRNA και τον υποκινητή LjU6 του *Lotus japonicus*. Ο δευτέρος στόχος της εργασίας ήταν η ένθεση του pUB500i ανοδικά του γονιδίου της hCas9 στο φορέα μέσω της τεχνολογίας Gateway® καθώς η έκφραση της hCas9 κάτω από τον υποκινητή CaMV 35S είναι ανεπαρκής, στην περίπτωση του *L. japonicus* (Maekawa et al. 2008). Αντίθετα, έχει αποδεικτεί ότι η μεταγραφική δραστηριότητα του υποκινητή της ουβικουιτίνης pUB500i είναι πολύ πιο υψηλή (Maekawa et al. 2008).

Δ. Τεχνολογία Gateway®

Η τεχνολογία Gateway® είναι μια σχετικά νέα μέθοδος κλωνοποίησης που σχεδιάστηκε για να ξεπεραστούν οι δυσκολίες των παραδοσιακών προσεγγίσεων κλωνοποίησης. Βασίζεται στον ανασυνδυασμό μεταξύ ειδικών θέσεων του ιικού και βακτηριακού γονιδιώματος που μεσολαβεί την ένθεση και εκτομή του βακτηριοφάγου λ (Landy 1989). Πιο συγκεκριμένα, ο ανασυνδυασμός με βάση το μοντέλο Holliday συμβαίνει μεταξύ των θέσεων attP του φάγου (phage DNA) και attB του βακτηριακού γονιδιώματος (bacterial DNA) από τις πρωτεΐνες integrase και IHF (integration host factor), ιικής και βακτηριακής προέλευσης αντίστοιχα. Η αντίδραση αυτή, που αναφέρεται ως αντίδραση BP (attB x attP), οδηγεί στην ενσωμάτωση του προφάγου στο βακτηριακό γονιδίωμα, ο οποίος πλαισιώνεται από τις υβριδικές θέσεις ανασυνδυασμού attL και attR. Το φαινόμενο της ενσωμάτωσης είναι αναστρέψιμο, καθώς η παρουσία της ιικής πρωτεΐνης excisionase, σε συνεργασία με τις προαναφέρουσες, επιτρέπει στον ιό να βγει από το χρωμόσωμα. Η αντίδραση, που αναφέρεται ως LR (attL x attR), πραγματοποιείται και αυτή βάση του μοντέλου Holliday (Εικόνα 7, αριστερά).



Εικόνα 7. Αντιδράσεις ανασυνδυασμού BP και LR *in vivo* (αριστερά) και *in vitro* (δεξιά)

Τα βέλη δείχνουν τον προσανατολισμό των θέσεων att. Οι εικόνες είναι προσαρμοσμένες από (Katzen 2007).

Μέσω μεταλλαξιγένεσης των παραπάνω θέσεων att δημιουργούνται παραλλαγές, πχ attB1, attB2, attP1, attP2, attL1, attL2, attR1, attR2, οι οποίες μπορούν να ανασυνδυαστούν με ακρίβεια και χωρίς διασταυρούμενη επικοινωνία (Brasch, Hartley, and Temple 2000). Για παράδειγμα, μπορεί να συμβεί ανασυνδυασμός μόνο μεταξύ attB1 και attP1 και όχι attB1 και attP2. Έτσι, δύο φορείς που φέρουν δύο τμήματα DNA, που περιβάλλονται από δύο θέσεις attB και attP αντίστοιχα, μπορούν να αναμειχθούν *in vitro* μαζί με τα ένζυμα ανασυνδυασμού καταλήγοντας στην ανταλλαγή των τμημάτων και στην παραγωγή των υβριδικών θέσεων attL και attR. Η προσθήκη της πρωτεΐνης excisionase αντιστρέφει την αντίδραση (Εικόνα 7, δεξιά).

Το προϊόν της αντίδρασης, στη συνέχεια, χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό βακτηρίων. Όσα βακτήρια λάβουν φορέα με το γονίδιο αυτοκτονίας ccdB δεν επιβιώνουν, διότι η παραγόμενη γυράση δρα ως 'τοξίνη' προκαλώντας ρήξεις στο δίκλωνο DNA (περισσότερες λεπτομέρειες για τους φορείς περιγράφονται στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι της παρούσας διατριβής). Επιπλέον, χρησιμοποιώντας φορείς με δύο διαφορετικά γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και επιστρώνοντας τα βακτήρια σε υπόστρωμα με το κατάλληλο αντιβιοτικό επιλέγονται μόνο τα βακτήρια που έλαβαν τον επιθυμητό φορέα (Katzen 2007).

Αφού κατανοήσαμε τον λόγο για τον οποίο είναι σημαντική η μεταλλαξιγένεση του *AMY2* και αφομοιώσαμε τις αρχές των τεχνολογιών CRISPR/Cas9 και Gateway®, προχωρήσαμε στο πειραματικό μέρος της εργασίας. Από τη μια πλευρά, σχεδιάστηκαν δύο guide RNAs που στοχεύουν δύο διαδοχικά ιντρόνια του *AMY2*. Η σύνθεση τους έγινε με τη μορφή μονόκλωνων αλυσίδων. Μετά από την υβριδοποίηση τους, ακολούθησε κλωνοποίηση των δύο δίκλωνων guide

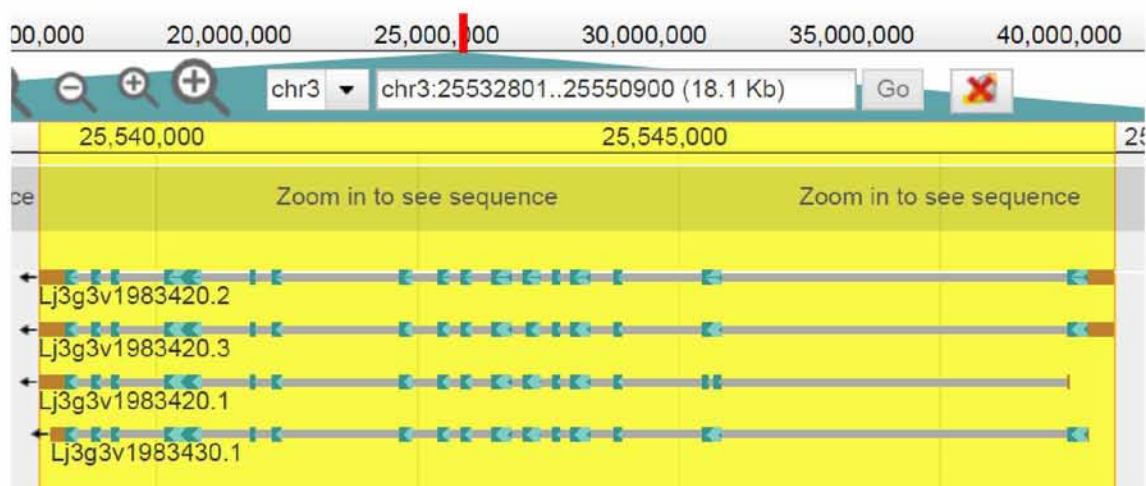
RNAs στον φορέα p1 sgRNA acceptor που φέρει τον υποκοινητή U6 του *L. japonicus* και το gRNA scaffold του οργανισμού *Streptococcus pyogenes*. Μέσω PCR ταυτοποιήθηκε η ύπαρξη μόνο του ανασυνδυασμένου φορέα με το guide RNA 2. Από την άλλη πλευρά, για να εισαχθεί ο υποκινητής pUB500i ανοδικά του γονιδίου της hCas9, πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικές αντιδράσεις ανασυνδυασμού BP και LR. Η τελική κατασκευή pUB500i-hCas9 επιβεβαιώθηκε με colony PCR. Λεπτομέρειες για την πορεία των πειραμάτων, την ανάλυση και τον σχολιασμό των αποτελεσμάτων περιγράφονται στην ενότητα Αποτελέσματα.

Αποτελέσματα

Α. Παραγωγή εξειδικευμένων sgRNAs

Σχεδιασμός των guide RNAs

Ο αρχικός στόχος της εργασίας ήταν η πρόκληση μιας σημειακής μετάλλαξης στην κωδική περιοχή του *AMY2* μέσω ενός συμπλόκου της πρωτεΐνης hCas9 και ενός εξειδικευμένου single guide RNA (sgRNA). Η αναζήτηση του κατάλληλου guide RNA ξεκίνησε με την εύρεση της γονιδιωματικής αλληλουχίας του *AMY2* που αποτελείται από 10.291 bp.



Εικόνα 8. Στιγμιότυπο οθόνης από τη πύλη Lotus Base όπου φαίνονται οι προβλεπόμενες ισομορφές του *AMY2* στο χρωμόσωμα 3

Με κίτρινο επισημαίνεται η περιοχή μεταξύ 25.538.876 και 25.549.166 bp. Η ισομορφή Lj3g3v1983420.2 είναι αυτή που έχει απομονωθεί από το εργαστήριο μας. Όπως υποδεικνύουν και τα βέλη, το γονίδιο μεταγράφεται με προσανατολισμό 3'→5', δηλαδή ο υποκινητής βρίσκεται στα δεξιά του γονιδιακού τόπου, καθοδικά του σημείου με συντεταγμένη 25.549.166. Οι πληροφορίες βασίζονται στην πιο πρόσφατη έκδοση του γονιδιώματος (*L. japonicus* MG20 v3.0 DNA sequence).

Υποβάλλοντας την αλληλουχία στο CRISPR-P 2.0 και επιλέγοντας τις κατάλληλες παραμέτρους εμφανίστηκε μια ποικιλία προτεινόμενων guide RNAs που στόχευαν σε εξόνια και σε ιντρόνια του *AMY2*. Εστίασαμε μόνο σε αυτά που στόχευαν σε εξόνια, καθώς μια μετάλλαξη στην κωδική περιοχή θα μετατοπίσει το πλαίσιο ανάγνωσης και θα επηρεάσει τη γονιδιακή έκφραση. Ωστόσο, όλα τα guide RNAs με υψηλό on-score (πάνω από 0,6) στόχευαν μη ειδικά και άλλες περιοχές του γονιδιώματος. Πιο συγκεκριμένα, στόχευαν την κωδική περιοχή άλλων γονιδίων που είτε είναι γνωστό ότι κωδικοποιούν συνθάσες της β-αμυρίνης είτε προβλέπεται βάση της

γονιδιωματικής αλληλουχίας τους. Μεταξύ αυτών ήταν και το γονίδιο *AMY1* (GenBank accession number: BAE53429) που κωδικοποιεί τη συνθάση της β-αμυρίνης. Το γονίδιο αυτό έχει χαρακτηριστεί προηγουμένως από το εργαστήριο μας και τους συνεργάτες του (Iturbe-Ormaetxe et al. 2003). Η αμινοξική του αλληλουχία εμφανίζει 94% ομοιότητα με αυτή του *AMY2* (Iturbe-Ormaetxe et al. 2003). Στοιχίση των δύο κωδικών αλληλουχιών αποκάλυψε –όπως ήταν αναμενόμενο– ένα τεράστιο βαθμό ομολογίας (Εικόνα 9). Υπήρχε μια περιοχή στο 3' άκρο όπου το *AMY2* δεν εμφάνιζε ομολογία με το *AMY1*. Η υποβολή της περιοχής αυτής στο CRISPR-P 2.0 αποκάλυψε κάποια guide RNAs που στόχευαν όμως την κωδική περιοχή άλλων γονιδίων που προβλέπεται ότι κωδικοποιούν συνθάσες της β-αμυρίνης.

CDSAMY1	CTGTTATCACTTCAGAGTAAAAAGGGTGGTTTGGCAGCATGGGAGCCAGCAGGAGCTCAA	1620
CDSAMY2	CTATTGTCACTTCAGGGTAAAAAGGGTGGTTTGGCAGTATGGGAGCCAGCAGGAGCTCAG	1620
* * * * *		
CDSAMY1	GAAATGGTTGGAGCTACTCAACCCACCGAATTTTTCGCGGATATTGTAGTTGAGCATGAA	1680
CDSAMY2	GAGTGGCTGGAAGTACTCAATCCTATAGAATTTTGGAGGACATTGTAATTGAGCATGAA	1680
* * * * *		
CDSAMY1	TATGTTGAGTGCCTGGATCTGCAATTGGAGCCTTAGTTTGTTCAGAAGCTATATCCA	1740
CDSAMY2	TTGGTTGAGTGCCTGGATCAGCAATTGGAGCCTTAGTTTGTTCAGAATCATTATCCA	1740
* * * * *		
CDSAMY1	GGGCATAGAAAGAAAGAAATTGAGAATTTCAATTCGGAAGCGGTTTCGATTCCTAGAAGAT	1800
CDSAMY2	GAGCATAGAAAGAAAGAGATCGAGGATTGCATTGCTAATGCAGTTTCGTTACTTTGAAGAT	1800
* * * * *		
CDSAMY1	ACACAAACTGCCGATGGTCTTGGTATGGAACTGGGGAGTTTGCTTCACCTACGGTCT	1860
CDSAMY2	ATACAAACAGCAGATGGTCTTGGTATGGAAATGCAGGAATTTGCTTCATTTATGGTACT	1860
* * * * *		
CDSAMY1	TGGTTCGCGCTTGGTGGTCTTGACGAGCTGGCAAGACTTATGCCAATTGTGCTGCCATT	1920
CDSAMY2	TGGTTTGCACTTGGTGGTCTAGAAGCAGCTGGCAAACTTATGCCAATTGTGCTGCCATT	1920
* * * * *		
CDSAMY1	CGCAAAGCTGTTAAATTTCTACTCACTACACAAAGAGGTGATGGCGGGTGGGGAGAGAGC	1980
CDSAMY2	CGCAAAGGTGTTAAATTTCTACTCACGACACAATCAAAGGATGGTGGGTGGGGAGAGAGT	1980
* * * * *		
CDSAMY1	TATTTGTCTAGCCCAAAAAAGATATATGTACCATTTGAAGGAAACCGATCAAATGTTGTA	2040
CDSAMY2	TATCTATCATGCCCAAAAAAGGTATATGTACCTCTTGAAGGAAACCGATCAAATGTTGTA	2040
* * * * *		
CDSAMY1	CATACAGCATGGGCTCTTATGGGTTTAATTCATTCTGGCCAGGCTGAGAGAGACCTACT	2100
CDSAMY2	CAGACAGCATGGGCTCTTATGGGTTTGATTGATGCTGGCCAGGCGGAGAGAGACCTACT	2100
* * * * *		
CDSAMY1	CCACTTCATCGTGCTGCAAAATTGCTCATCAATTCTCAGCTTGAAGAGGGTGATTGGCCC	2160
CDSAMY2	CCACTTCACCGTGCTGCAAAATTGCTCATCAATTCTCAGCTTGAAGATGGTGATTGGCCC	2160
* * * * *		
CDSAMY1	CAACAGGAAATCACTGGAGTATTCATGAAAAATTGTATGCTGCATTATCCAATGTAC---	2217
CDSAMY2	CAACAGGATATTACTGGTGTGTACGTGAAAAATTGCACGCTGCATTACCCAATGTACAGA	2220
* * * * *		
CDSAMY1	-----	2217
CDSAMY2	AATAATTTTACAACGATGGCCCTAGCTGAATATCGTCGACGGGTTCCATTACCATCCATT	2280
* * * * *		
CDSAMY1	----- 2217	
CDSAMY2	GCAGTTTAA 2289	

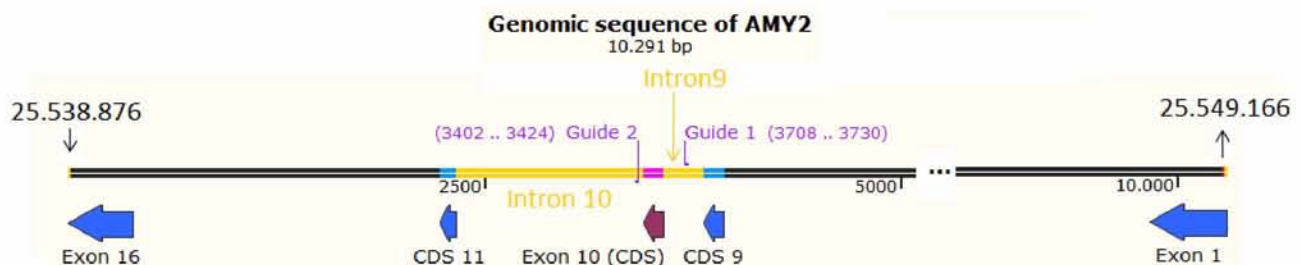
Εικόνα 9. Τμήμα της στοίχισης κωδικής αλληλουχίας των AMY1 και AMY2

Η στοίχιση έγινε με το εργαλείο Clustal Omega. Με αστερίσκο επισημαίνεται η ταύτιση των νουκλεοτιδίων στη συγκεκριμένη θέση. Το κόκκινο πλαίσιο δείχνει την περιοχή έλλειψης ομολογίας του AMY2 με το AMY1.

Από την άλλη μεριά, ήταν εμφανές ότι τα guide RNAs, που στόχευαν σε ιντρόνια, δεν παρουσίαζαν τόσο σοβαρές επιδράσεις μη ειδικής στόχευσης. Ειδικότερα, είτε αναγνώριζαν την κωδική περιοχή γονιδίων με κάποιες αναντιστοιχίες είτε περιοχές ιντρονίων και μεταξύ γονιδίων

χωρίς αναντιστοιχίες. Ωστόσο, μια σημειακή μετάλλαξη που εντοπίζεται σε μια περιοχή που δεν παράγει πρωτεΐνη ή που δεν επηρεάζει το εναλλακτικό μάτισμα ίσως να μην επηρεάσει την έκφραση του γονιδίου. Επομένως, ακολουθήσαμε την επόμενη λογική πορεία, τον σχεδιασμό δύο guide RNAs που στοχεύουν σε δύο διαδοχικά ιντρόνια. Ο στόχος είναι η πρόκληση δύο θραύσεων διπλής έλικας εκατέρωθεν ενός εξονίου από δύο σύμπλοκα της Cas9 με το κάθε sgRNA. Το έλλειμμα που θα δημιουργηθεί από την απομάκρυνση του τμήματος αυτού θα επιδιορθωθεί μέσω του υπερσχύοντος μηχανισμού επιδιόρθωσης άκρων με μη ομόλογη σύνδεση (NHEJ).

Για το σχεδιασμό των guide RNAs που στοχεύουν σε ιντρόνια εφαρμόστηκαν οι ίδιες παράμετροι. Τελικά, επιλέχθηκαν δύο guide RNAs, έστω guide 1 και guide 2, με on-score 0,8367 και 0,7321 αντίστοιχα. Η υψηλή τιμή του on-score προβλέπει υψηλή απόδοση στόχευσης. Το guide 1 στοχεύει το ιντρόνιο 9 και το guide 2 το ιντρόνιο 10, ενώ ενδιάμεσα εντοπίζεται το εξόνιο 10. Το τμήμα που υπολογίζεται ότι θα αποκοπεί είναι περίπου 300 bp (Εικόνα 10). Το μέγεθος του εξονίου 10 είναι 123 bp και κωδικοποιεί 41 αμινοξέα (Εικόνα 11). Το μοτίβο αμινοξέων DCTAE που εντοπίζεται εντός του εξονίου 10 έχει φανεί ότι εμπλέκεται στην δέσμευση του υποστρώματος. Δηλαδή το τμήμα που θα αποκοπεί αποτελεί μέρος του καταλυτικού κέντρου της παραγόμενης συνθάσης (Salmon et al. 2016).



Εικόνα 10. Χάρτης γονιδιωματικής αλληλουχίας του *AMY2*, όπου φαίνονται οι στόχοι των guide RNAs. Φαίνονται τα guide RNAs 1 και 2 (με μωβ) που στοχεύουν τα ιντρόνια 9 (25.542.455-25.542.692 bp) και 10 (25.541.207-25.542.331) αντίστοιχα (με πορτοκαλί). Ενδιάμεσα βρίσκεται το εξόνιο 10 (25.542.332-25.542.454) που θα αποκοπεί (σκούρο μωβ). Εκατέρωθεν των ιντρονίων φαίνονται τα εξόνια 9 και 11 (με γαλάζιο), καθώς και τα εξόνια 1 και 16 που αποτελούνται από τις UTR και τις περιοχές κωδικής αλληλουχίας 1 και 16. Οι αλληλουχίες των guides RNAs προέρχονται από το CRISPR-P 2.0. Οι αλληλουχίες και οι συντεταγμένες προέρχονται από το Lotus Base. Η απεικόνιση έγινε με το πρόγραμμα SnapgeneViewer.

number of offtarget sites: 20

top 20 genome-wide off-target sites

Sequence	Off-score ⑦	MMs⑦	Locus	Gene	Region
CACTGCATAGAAAAGCCATAGGG	1.000	0MMs	chr3:+25794490	Lj3g3v2015970	intron
CAATGCATAAAAAAGACATATGG	0.809	3MMs	chr1:-33551773	Lj1g3v2953570	intron
CACTACAAAAAAGCAATAGGG	0.302	4MMs	chr0:+34565369		Intergenic
CAAAGCTTAGAAAAAGACATATGG	0.181	4MMs	chr0:-138211182		Intergenic
CACTGCAGAAAAACAGACATAGGG	0.144	4MMs	chr4:+7060652	Lj4g3v0472850	intron
CACTGCAGAAAAACAGACATAGGG	0.144	4MMs	chr2:-41613877	Lj2g3v3249960	intron
CATTGCAGAAAAAATAGATAGG	0.134	4MMs	chr0:+179549189		Intergenic
CTCTGCATGAAAAAGCATTAGGG	0.113	4MMs	chr2:-6159248		Intergenic
CACAGCTTATAAAAGCCATTGGG	0.102	4MMs	chr0:-84573893	Lj0g3v0175299	exon
CACAGCTTATAAAAGCCATTGGG	0.102	4MMs	chr4:-26931932		Intergenic
CACAGCATGAAAAAGCCATAGAG	0.077	3MMs	chr5:+25352003	Lj5g3v1777190	CDS
CACTGCTTGGCAAAGCTATATGG	0.054	4MMs	chr6:+23356287	Lj6g3v2006070	CDS
CACTGCTTGGCAAAGCTATATGG	0.054	4MMs	chr3:+4987868		Intergenic
CAATGCATACAAAAGCTAAAGG	0.046	4MMs	chr1:-58257108	Lj1g3v4830120	intron
AACTGCATCCAGAGCCATAGAG	0.043	4MMs	chr0:+166361036	Lj0g3v0318539	CDS
CACAGCAGAAAAAGCCAGAGAG	0.021	4MMs	chr1:-54738976		Intergenic
CACGTATACAAAACCAATAGAG	0.012	4MMs	chr0:+28892771		Intergenic
ATCTGCATAGAAAATTATAGAG	0.008	4MMs	chr0:-53933639	Lj0g3v0121089	intron
CACAGCATACAAATGCCATCGAG	0.006	4MMs	chr5:-8828393		Intergenic
CACAGCATACAAATGCCATCGAG	0.006	4MMs	chr1:-41777042		Intergenic

Εικόνα 12. Θέσεις off-targets του guide RNA 1

Με κόκκινο απεικονίζονται οι αναντιστοιχίες (mismatches) του guide RNA 1 με την κάθε αλληλουχία off-target. Υπογραμμισμένο με κίτρινο φαίνονται τα νουκλεοτίδια του guide RNA 1, ενώ με πράσινο η αλληλουχία PAM.

number of offtarget sites: 29

top 20 genome-wide off-target sites

Sequence	Off-score ⑦	MMs⑦	Locus	Gene	Region
TGACATCTCGAGTTTTCACATTTGG	1.000	0MMs	chr3:-25794173	Lj3g3v2015970	intron
TGATATCATGAGTTTTCACATTTGG	0.560	3MMs	chr2:+11770672	Lj3g3v2015980	Intergenic
TGAGATTTCAGTTTTCATATAGG	0.244	4MMs	chr0:-46502496	Lj0g3v0107819	intron
TGAGATTTCAGTTTTCATATAGG	0.244	4MMs	chr0:-143297		Intergenic
TGAGATTTCAGTTTTCATATAGG	0.244	4MMs	chr0:-128426		Intergenic
TGACAACTCAAGTTTTCACATCAG	0.210	2MMs	chr1:+31619624		Intergenic
TGACAACTCAAGTTTTCACATCAG	0.210	2MMs	chr0:+133709716		Intergenic
TGACAACTCAAGTTTTCACATCAG	0.210	2MMs	chr0:+91685665		Intergenic
TGACATCTTTAGATTTCACATTTGG	0.185	4MMs	chr6:+23606623		Intergenic
TGATATTTCAGAGTTTCACATTTGG	0.159	4MMs	chr3:-40312609		Intergenic
TGATATTTCAGAGTTTCACATTTGG	0.159	4MMs	chr3:+32016790		Intergenic
TGATGTTCTAGAGTTTCACATTTGG	0.141	4MMs	chr0:-47757496	Lj0g3v0110109	intron
TGATATTTCAGAGTTTCACATTTGG	0.110	4MMs	chr3:+15649968		Intergenic
TCACATCTGGGTTTTCACATCGG	0.107	4MMs	chr3:-8447395		Intergenic
TCACATCTGGGTTTTCACATCGG	0.107	4MMs	chr0:+107756704		Intergenic
TGACATCACCAAGATTTCACATTTGG	0.083	4MMs	chr1:-28733596	Lj1g3v2482340	exon
TGATGTTCTTAGTTTTCACATAGG	0.083	4MMs	chr3:+30755358	Lj3g3v2515440	intron
TGATGTTCTTAGTTTTCACATAGG	0.083	4MMs	chr4:+21975563	Lj4g3v1388610	intron
TGACTTTTCAGGTTTTCACATTTGG	0.072	4MMs	chr0:-44349487		Intergenic
TGTTCTTTTCAGTTTTCACATTTGG	0.064	4MMs	chr4:+6220573		Intergenic

Εικόνα 13. Θέσεις off-targets του guide RNA 2

Με κόκκινο απεικονίζονται οι αναντιστοιχίες (mismatches) του guide RNA 2 με την κάθε αλληλουχία off-target. Υπογραμμισμένο με κίτρινο φαίνονται τα νουκλεοτίδια του guide RNA 2, ενώ με πράσινο η αλληλουχία PAM.

CDSAMY2	ATGTGGAAGCTGAAGGTAGCAGATGGTGGCAAGAACCCATACATATTCAGCATCAACAAC	60
CDSAMY2like	-----	0
CDSAMY2	TTCGTGGGAAGGCAGACATGGGAGTATGATCCTGATGCAGGTA	120
CDSAMY2like	-----	0
CDSAMY2	CAGGTTGAAGAAGCTCGTCAGGATTTCTATAACAACCGCTACGAGGTCAAGACCTGTGGC	180
CDSAMY2like	-----	0
CDSAMY2	GACCGGCTTTGGCGGTTTCAGGTTATGAGGGAAAATAACTTCAAACAAACAATACCGAGT	240
CDSAMY2like	-----	0
CDSAMY2	GTGAAGATAGAGGATGGAGAGGAGGTAACATACGATAAAGTGACAACAACCTGTGAGAAGG	300
CDSAMY2like	-----	0
CDSAMY2	GCCGCACATCACCTAGCAGGATTACAGACCAGTATGGCCATTGGCCTGCTCAAATTGCT	360
CDSAMY2like	-----	0
CDSAMY2	GGTCCTCTGCTTTTCACGCCTCCCTTGGTCTTTTGTATGTACATAACAGGTCATCTTGAT	420
CDSAMY2like	-----	0
CDSAMY2	TCTGTATTTCCAGAAAGTGTACCGCAAAGAGATTCTTCGTTACACATACGTTTCATCAGGAT	480
CDSAMY2like	-----	0
CDSAMY2	GAAGATGGAGGGTGGGGACTACACATAGAGGGTCATAGCACCATGTTTGTACTGTACTC	540
CDSAMY2like	-----	0
CDSAMY2	AACTACATATGCATGCGAATACTTGGAGAAGGACCTGATGGAGGTCAAGACAATGCTTGT	600
CDSAMY2like	-----	0
CDSAMY2	GCAAGAGCAAGAAAATGGATTATGATCATGGGGGCGCGACACACATAGCTTCTTGGGGG	660
CDSAMY2like	-----	0
CDSAMY2	AAGACATGGCTTTCGGTACTTGGTATATTTGATTGGAGCGGAACCAATCCAATGCCTCCA	720
CDSAMY2like	-----ATGCCTCCA	9

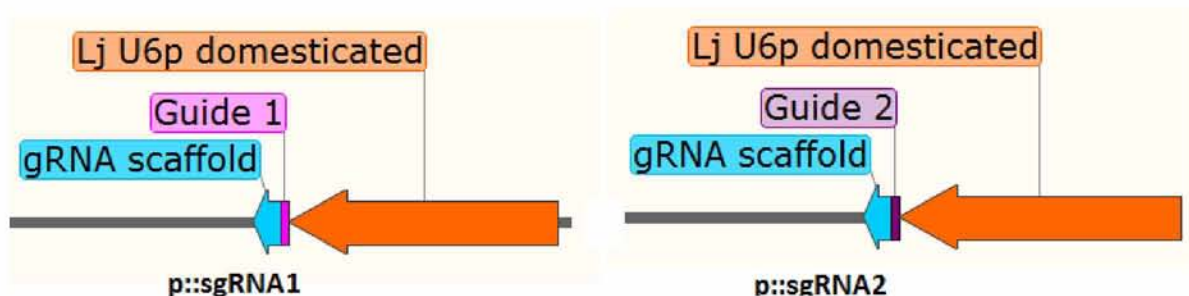
CDSAMY2	GAATTTTGGATCCTTCCTTCATTTCTTCTATGCATCCAGGTAAAATGTGGTGTTATTGC	780
CDSAMY2like	GAATTTTGGATCCTTCCTTCATTTCTTCTATGCATCCAGGTAAAATGTGGTGTTATTGC	69

Εικόνα 14. Τμήμα της στοίχισης κωδικής αλληλουχίας των *AMY2* και *AMY2-like*

Η στοίχιση έγινε με το εργαλείο Clustal Omega. Με αστερίσκο επισημαίνεται η ταύτιση των νουκλεοτιδίων στη συγκεκριμένη θέση. Το κόκκινο πλαίσιο δείχνει την περιοχή των 700 νουκλεοτιδίων που λείπουν από το 5' άκρο του *AMY2-like*.

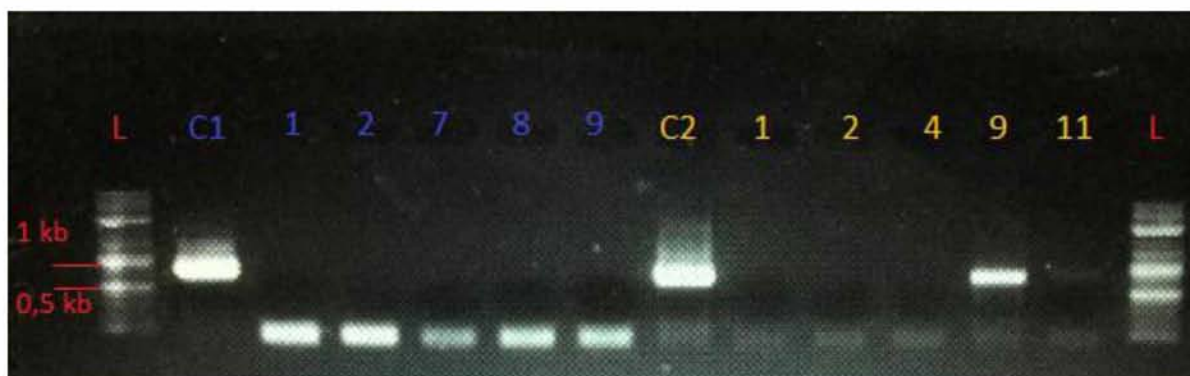
Σύνθεση και εισαγωγή των guide RNAs σε πλασμιδιακό φορέα

Μετά τον σχεδιασμό των guide RNAs και τον έλεγχο των επιδράσεων της ειδικής και μη ειδικής στόχευσης, ακολούθησε η σύνθεση τους με τη μορφή μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδικών αλυσίδων forward και reverse. Στο 5' άκρο της αλυσίδας forward προστέθηκε το 5'TTC3' και στο 5' άκρο της αλυσίδας reverse το 5'AAC3'. Ακολούθησε υβριδοποίηση των δύο αλυσίδων, ώστε να δημιουργηθεί ένα δίκλωνο μόριο με 5'προεξέχοντα άκρα, τα οποία ήταν συμπληρωματικά με τα άκρα που δημιουργήθηκαν μετά την πέψη του φορέα p1 sgRNA acceptor με το ένζυμο SapI. Η αντίδραση σύνδεσης οδήγησε στο σχηματισμό των φορέων p::sgRNA1 και p::sgRNA2, που φέρουν το τμήμα LjU6p-guideRNA-gRNAscaffold.



Εικόνα 15. Τμήμα των ανασυνδυασμένων φορέων p::sgRNA1 και p::sgRNA2

Ακολούθησε μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων DH5a και επίστρωση σε τρυβλία με καρμπενικιλίνη 100μg/ml. Παρατηρήθηκε ανάπτυξη αρκετών αποικιών. Για την ταυτοποίηση απομονώθηκαν πέντε από κάθε κατασκευή και ακολούθησε ανάπτυξη σε υγρές καλλιέργειες LB με καρμπενικιλίνη 100μg/ml. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδίου (χωρίς kit) και ενίσχυση μιας περιοχής 830 bp με PCR χρησιμοποιώντας τα εξής ζεύγη εκκινητών: AMY2guideRNA1R και LjU6p1f για την ανίχνευση του guide 1, AMY2guideRNA2R και LjU6p1f για την ανίχνευση του guide 2, όπου ο reverse είναι η μια αλυσίδα του guide και ο forward υβριδίζεται στην αρχή του υποκινητή LjU6. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% (Εικόνα 16).



Εικόνα 16. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων ενίσχυσης της PCR της αντίδρασης πέψης και σύνδεσης σε πηκτική αгарόζης 1%

Με μπλέ (1, 2, 7, 8, 9) υποδεικνύονται οι αποικίες της κλωνοποίησης του guide 1 στον p1 sgRNA acceptor και με πορτοκαλί (1, 2, 4, 9, 11) οι αποικίες της κλωνοποίησης του guide 2 στον ίδιο φορέα. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος LjU6p1f και LjU6p3r που ενισχύει μια περιοχή 804 bp, η οποία διακρίνεται και στα δύο δείγματα control. Επίσης, διακρίνεται η αναμενόμενη ζώνη των 830 bp του guide 2 της αποικίας 9.

Φαίνεται ότι ενισχύθηκε το επιθυμητό τμήμα των 830bp μόνο στην αποικία 9 που αντιστοιχεί στην αντίδραση κλωνοποίησης του guide 2 στο φορέα p1 sgRNA acceptor. Δυστυχώς, φαίνεται ότι καμία από τις αποικίες που ελέγχθηκαν δεν φέρει το ανασυνδυασμένο φορέα με το guide 1. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετές ακόμη αποικίες που μπορούν να ελεγχθούν. Λόγω έλλειψης χρόνου το συγκεκριμένο πειραματικό μέρος σταμάτησε εδώ.

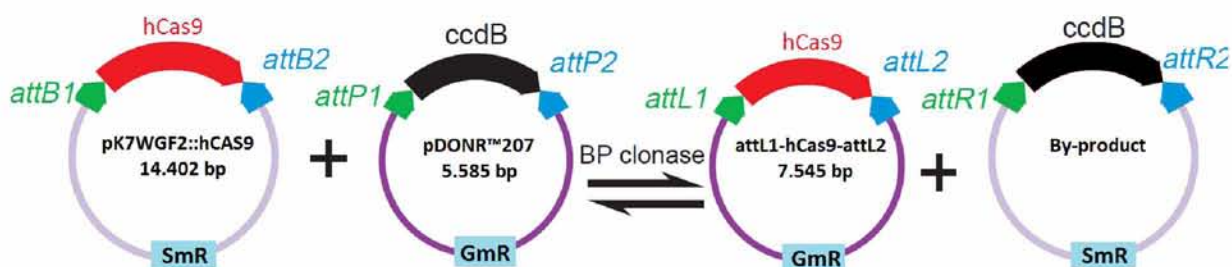
B. Έκφραση της *Cas9* υπό τον υποκινητή της ουβικουιτίνης

Βελτίωση των παραμέτρων των αντιδράσεων ανασυνδυασμού BP και LR

Σύμφωνα με τον οδηγό χρήσης της εταιρείας Invitrogen για την αύξηση της απόδοσης των αντιδράσεων ανασυνδυασμού BP και LR προτείνεται η χρήση ισομοριακής ποσότητας πλασμιδίων που έχουν απομονωθεί με kit, διότι η ύπαρξη αλάτων και άλλων συστατικών μπορεί να αναστείλει τη δραστηριότητα των ενζύμων. Ως προς τη στοιχειομετρία της αντίδρασης BP, σε τελικό όγκο 10μl χρησιμοποιήθηκαν 30fmol του πλασμιδίου pK7WGF2::hCas9 και 30fmol του πλασμιδίου pDONR™207, τα οποία αναλογούν σε 102ng και 259,5ng αντίστοιχα. Ομοίως για την αντίδραση LR, σε τελικό όγκο 10μl χρησιμοποιήθηκαν 20fmol του πλασμιδίου attL1-hCas9-attL2 και 20fmol

του πλασμιδίου pUB-GWS-Hyg, τα οποία αναλογούν σε 92ng και 150ng αντίστοιχα. Με βάση αυτές τις ποσότητες έγιναν και οι ανάλογες αραιώσεις. Σχετικά με τις συνθήκες επώασης, ο χρόνος επώασης αυξάνει αναλογικά, ως ένα σημείο, με το μέγεθος των φορέων. Επειδή οι φορείς pK7WGF2::hCas9 και pUB-GWS-Hyg ξεπερνούν κατά πολύ σε μέγεθος τις 5kbp, κρίθηκε απαραίτητο να αυξηθεί ο χρόνος επώασης από τη συνήθη προτεινόμενη 1 ώρα σε 18 στους 25°C. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν μέσα σε επωστήρα και όχι σε θερμοκρασία δωματίου που ίσως πλησιάζει τους 25°C.

Αντίδραση ανασυνδυασμού BP (attB x attP)



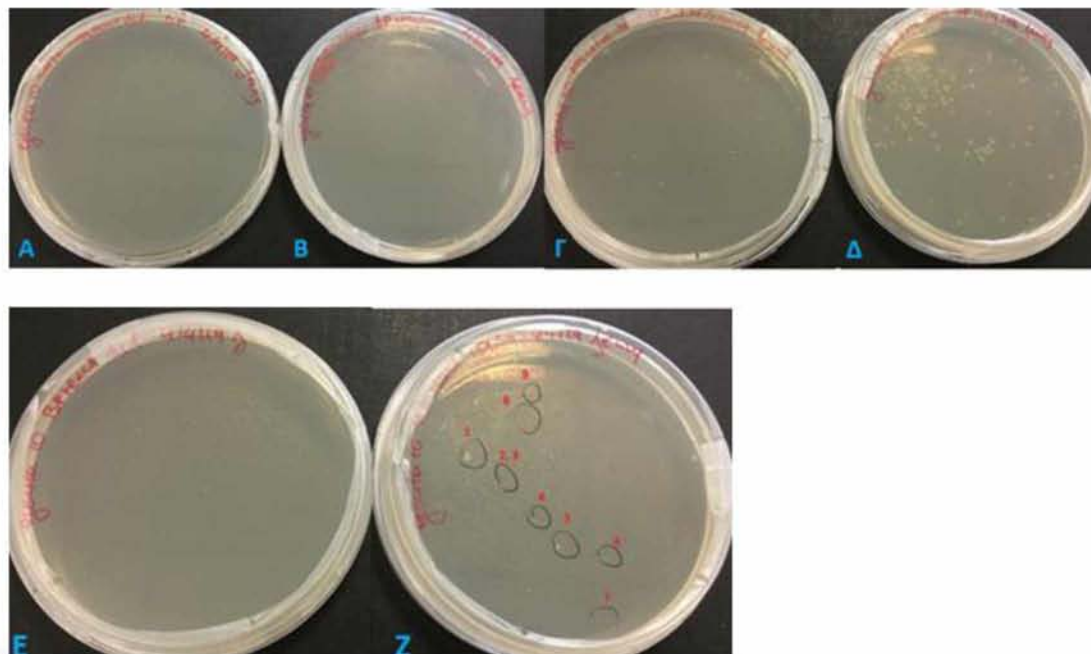
Εικόνα 17. Αντίδραση ανασυνδυασμού BP

Η αντίδραση ανασυνδυασμού BP (attB x attP) επιτεύχθηκε με την, *in vitro*, ανάμειξη των εξής συστατικών: α) το πλασμίδιο pK7WGF2::hCas9 (14.402bp) που φέρει το γονίδιο της hCas9 (4.140bp) πλαισιωμένο από τις θέσεις ανασυνδυασμού attB1 και attB2, β) το πλασμίδιο pDONR™207 (5.585bp) που φέρει το γονίδιο αυτοκτονίας ccdB πλαισιωμένο από τις θέσεις ανασυνδυασμού attP1 και attP2 και γ) το μίγμα των πρωτεϊνών ανασυνδυασμού BP Clonase™ enzyme mix. Το κύριο προϊόν της αντίδρασης BP είναι το πλασμίδιο attL1-hCas9-attL2 (7.545bp) που αποτελείται από τον σκελετό του pDONR™207 και το γονίδιο της hCas9 πλαισιωμένο από τις πλέον υβριδικές θέσεις ανασυνδυασμού attL1 και attL2. Το πλασμίδιο που φέρει τις θέσεις attR1 και attR2 θεωρείται παραπροϊόν. Για τον έλεγχο της επιτυχίας της αντίδρασης και την επιλογή του επιθυμητού πλασμιδιακού φορέα attL1-hCas9-attL2, ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *E. coli* στέλεχος DH5a.

- Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pEXP7-tet στη θέση του pK7WGF2::hCas9. Περιέχει το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη πλαισιωμένο από τις θέσεις ανασυνδυασμού attB1 και attB2.

Ποσότητα των αντιδράσεων ανασυνδυασμού BP χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό βακτηρίων *E.coli* στέλεχος DH5a με τη μέθοδο του θερμικού shock (heatshock).

Μετασχηματισμένα βακτήρια επιστρώθηκαν σε τρυβία LB με αντιβιοτικό γενταμυκίνη 10μg/ml. Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων στους 37°C για 18 ώρες σε στατικό επωαστήρα (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Ανάπτυξη μετασχηματισμένων αποικιών με το προϊόν της αντίδρασης ανασυνδυασμού BP σε θρεπτικό LB με γενταμυκίνη 10μg/ml, έπειτα από επώαση των τρυβλίων στους 37°C για 18 ώρες
Α) Αρνητικό control: επίστρωση αραιωμένου διαλύματος μη μετασχηματισμένων βακτηρίων. Β) Αρνητικό control: επίστρωση συμπυκνωμένου διαλύματος μη μετασχηματισμένων βακτηρίων. Γ) Θετικό control: επίστρωση αραιωμένου διαλύματος μετασχηματισμένων βακτηρίων. Δ) Θετικό control: επίστρωση συμπυκνωμένου διαλύματος μετασχηματισμένων βακτηρίων. Ε) Επίστρωση αραιωμένου διαλύματος μετασχηματισμένων βακτηρίων με το προϊόν της αντίδρασης ανασυνδυασμού BP του pK7WGF2::hCas9. Ζ) Επίστρωση συμπυκνωμένου διαλύματος μετασχηματισμένων βακτηρίων με το προϊόν της αντίδρασης ανασυνδυασμού BP του pK7WGF2::hCas9.

Με μια πρώτη ματιά στα τρυβλία με το αρνητικό control δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών, επιβεβαιώνοντας ότι το συγκεκριμένο στέλεχος δεν εμφανίζει ενδογενή ανθεκτικότητα στη γενταμυκίνη και οι αποικίες που αναπτύχθηκαν στα άλλα τρυβλία δεν αποτελούν επιμόλυνση.

Στα τρυβλία της αντίδρασης ανασυνδυασμού BP θετικού control παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών, αν και ο αριθμός αυτών θεωρείται μικρός. Αυτό οφείλεται, όπως και θα γίνει αντιληπτό στην επόμενη αντίδραση ανασυνδυασμού LR, στο πλασμίδιο pDONR™207. Γενικά, έχει διαπιστωθεί, κατά τη διάρκεια των πειραμάτων που έχουν γίνει στο εργαστήριο μας, πως ο συγκεκριμένος φορέας, είτε ολόκληρος είτε μόνο ο σκελετός του, δυσκολεύει την ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών DB3.1 και DH5a αντίστοιχα. Προς το παρόν δεν έχουμε υπόψιν κάποιον

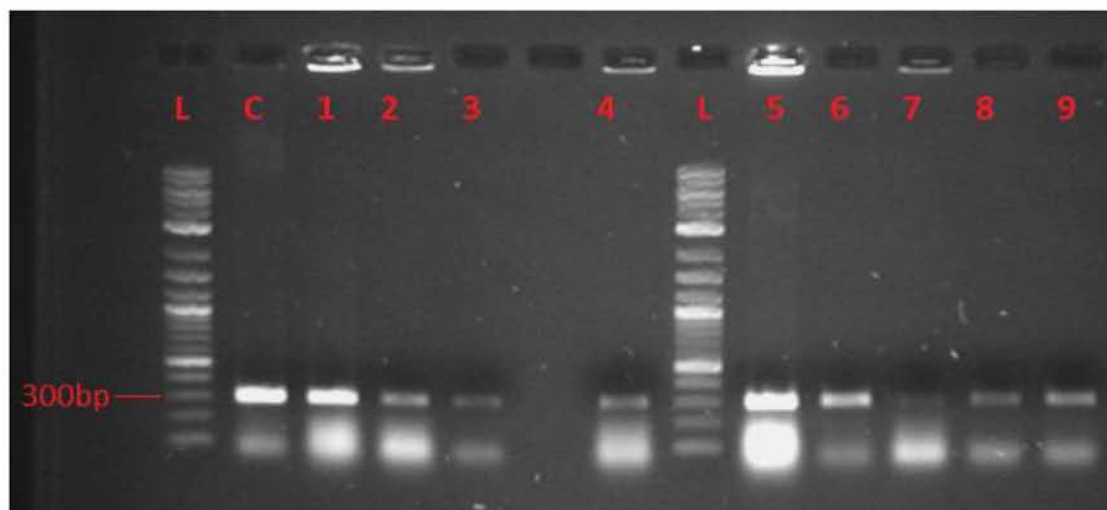
άλλο φορέα με τις θέσεις ανασυνδυασμού attP, ο οποίος να είναι συμβατός, ως προς το γονίδιο ανθεκτικότητας, με τους πλασμιδιακούς φορείς που εμείς χρησιμοποιούμε στο εργαστήριο μας.

Στα τρυβλία της αντίδρασης ανασυνδυασμού BP του πλασμιδίου pK7WGF2::hCas9 παρατηρήθηκαν μόνο εννιά αποικίες, από τις οποίες μόνο τρεις είχαν αναπτυχθεί σε ένα ικανοποιητικό βαθμό (1, 5 και λιγότερο η 7). Η πολύ χαμηλότερη απόδοση αυτής της αντίδρασης σε σχέση με την απόδοση της αντίδρασης θετικού control οφείλεται στο υπερβολικά μεγάλο μέγεθος του πλασμιδίου pK7WGF2::hCas9 (14.402bp), αλλά και στο μεγάλο μέγεθος του γονιδίου της hCas9 (4.140bp).

Τέλος, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία επιλογής των μετασχηματισμένων βακτηρίων, η οποία και καθορίζει τον τελικό αριθμό αποικιών που θα σχηματιστούν. Μετά το πέρας της αντίδρασης BP υπάρχουν και οι τέσσερις πλασμιδιακοί φορείς. Με το μίγμα αυτό μετασχηματίζουμε βακτήρια που επιστρώνονται σε τρυβλία με αντιβιοτικό. Ωστόσο, όσα πήραν ένα από τα δύο πλασμίδια με το γονίδιο ccdB και όσα πήραν το πλασμίδιο με το “λάθος” γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά δεν επιβιώνουν για να σχηματίσουν αποικίες.

Θεωρητικά, η διαδικασία επιλογής των μετασχηματισμένων βακτηρίων πιστοποιεί την ταυτότητα των αποικιών. Πρακτικά, αυτό δεν ισχύει πάντα, καθώς πρόκειται για μοριακές αντιδράσεις και βιολογικά συστήματα που είναι απρόβλεπτα. Πιο συγκεκριμένα, οι εννέα αποικίες είναι πιθανόν είτε να φέρουν το επιθυμητό πλασμίδιο attL1-hCas9-attL2 που προσδίδει ανθεκτικότητα στη γενταμυκίνη, είτε να φέρουν τον σκελετό του pDONR™207 που και αυτός προσδίδει ανθεκτικότητα στο ίδιο αντιβιοτικό, χωρίς όμως το γονίδιο ccdB. Επειδή, λοιπόν, υπάρχει αυτή η πιθανότητα χρειάζεται να ταυτοποιηθεί το είδος του πλασμιδιακού φορέα της κάθε αποικίας.

Κρίθηκε απαραίτητο να ελεγχθούν και οι εννιά αποικίες για την ύπαρξη του πλασμιδίου attL1-hCas9-attL2, διότι η πρώτη προσπάθεια ανασυνδυασμού των δύο πλασμιδιακών φορέων pK7WGF2::hCas9 και pDONR™207 ήταν ανεπιτυχής. Χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών hCas9 2f και hCas9 2r για την ενίσχυση τμήματος 290bp του γονιδίου της hCas9. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε απομονωμένο pK7WGF2::hCas9. Η μεταφορά της κάθε εξεταζόμενης αποικίας σε νέο τρυβλίο LB με το ίδιο αντιβιοτικό έγινε για τη φύλαξη της αποικίας για μελλοντική χρήση. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων ενίσχυσης σε πηκτή αгарόζης 1% (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων ενίσχυσης της colony PCR της αντίδρασης ανασυνδυασμού BP σε πηκτή αгарόζης 1%

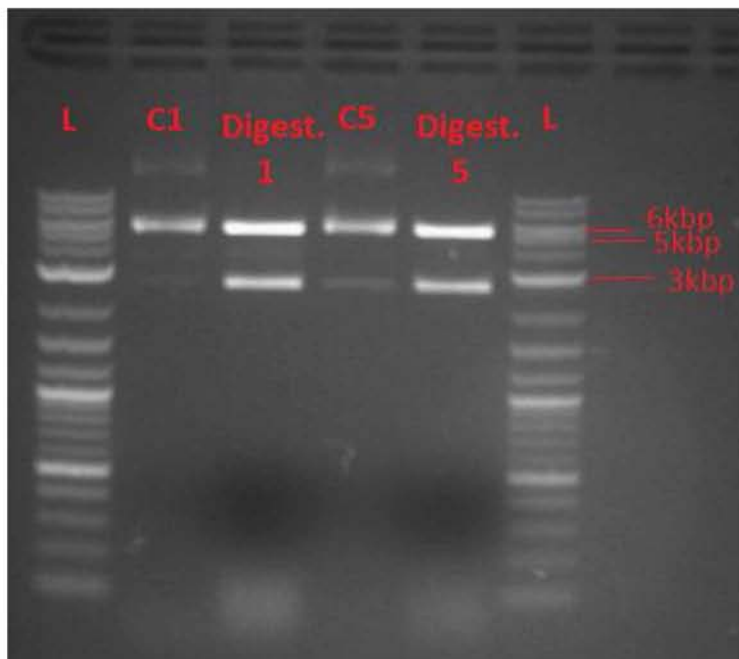
Το ζεύγος εκκινητών hCas9 2f και hCas9 2r χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τμήματος 290bp του γονιδίου της hCas9. L: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους, C: απομονωμένο pK7WGF2::hCas9 ως θετικό control, 1 έως 9: αποικίες 1 έως 9 αντίστοιχα. Διακρίνεται η αναμενόμενη ζώνη των 300bp στο θετικό control και σε όλες τις αποικίες.

Φαίνεται ότι ενισχύθηκε το επιθυμητό κομμάτι της hCas9 και στις εννιά αποικίες και για αυτό παρατηρείται η ζώνη στις 300bp. Με βάση την εικόνα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων ενίσχυσης της colony PCR συνάγεται ότι και οι εννιά αποικίες φέρουν το επιθυμητό πλασμίδιο attL1-hCas9-attL2, που προσδίδει ανθεκτικότητα στη γενταμυκίνη. Ωστόσο, παρατηρώντας τα τρυβλία LB με γενταμυκίνη, στα οποία μεταφέρθηκαν για να διατηρηθούν οι αποικίες 1 έως 9, μόνο οι 1, 5 και 7 αναπτύχθηκαν (με τις 1 και 5 να εμφανίζουν και στο τρυβλίο αυτό καλύτερη ανάπτυξη από την 7). Αυτό υποδεικνύει ότι οι υπόλοιπες δεν ήταν μετασχηματισμένες με το attL1-hCas9-attL2, αλλά με το αρχικό πλασμίδιο pK7WGF2::hCas9 που φέρει το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στη σπεκτινομυκίνη.

- Οι αποικίες 2, 3, 4 και 6, 8, 9 χαρακτηρίζονται ως “satellite”, λόγω του μικρού μεγέθους τους. Ουσιαστικά, δεν προέρχονται από μετασχηματισμένα βακτήρια που φέρουν τον επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα με το γονίδιο ανθεκτικότητας για το οποίο γίνεται η επιλογή. Για το λόγο αυτό, όπως έγινε και κατανοητό από το συγκεκριμένο πείραμα, πρέπει να αγνοούνται κατά την ανάλυση των αποικιών. Στο σημείο αυτό να τονιστεί ότι και στα τρυβλία αρνητικού control, έπειτα από 2-3 ημέρες, εμφανίστηκαν τέτοιου είδους αποικίες.

Για την ταυτοποίηση των αποικιών 1 και 5 ακολούθησε απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση χωρίς kit (miniprepARATION). Η πέψη των απομονωμένων πλασμιδίων των αποικιών

1 και 5 έγινε με το ένζυμο ECORV, το οποίο αναγνωρίζει και κόβει το φορέα σε δύο θέσεις, μια εντός του γονιδίου της hCas9 και μια εντός του γονιδίου ανθεκτικότητας στη γενταμυκίνη. Τα τμήματα που δημιουργούνται έχουν μέγεθος 5.031bp και 2.514bp. Για τον έλεγχο του αριθμού και του μεγέθους των τμημάτων ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% (Εικόνα 20).



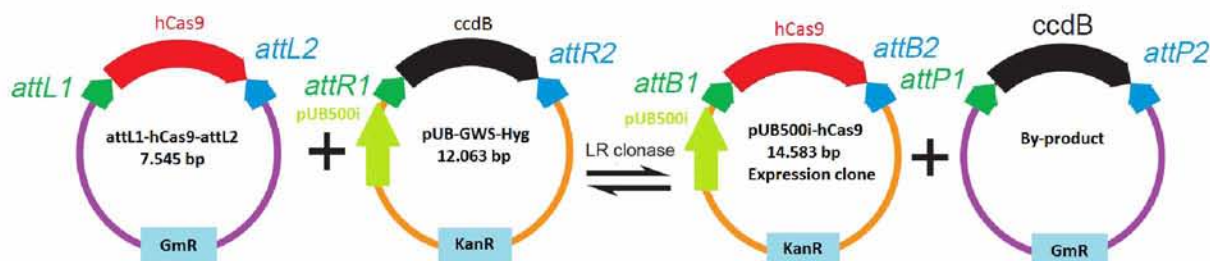
Εικόνα 20. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης πλασμιδιακού DNA που προέρχεται από τις αποικίες 1 και 5 της αντίδρασης ανασυνδυασμού BP σε πηκτή αгарόζης 1%

Το ECORV αναγνωρίζει και κόβει δύο φορές το φορέα attL1-hCas9-attL2 (7.545bp), αφήνοντας δύο τμήματα των 5.031bp και 2.514bp. L: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους, C1: απομονωμένο πλασμίδιο της αποικίας 1 που δεν έχει κοπεί, Digested 1: απομονωμένο πλασμίδιο της αποικίας 1 που έχει κοπεί, C5: απομονωμένο πλασμίδιο της αποικίας 5 που δεν έχει κοπεί, Digested 5: απομονωμένο πλασμίδιο της αποικίας 5 που έχει κοπεί. Διακρίνεται μια έντονη ζώνη μεταξύ 5-6 kbp στα δείγματα control, που αντιπροσωπεύει τον ολόκληρο φορέα. Στα προϊόντα πέψης διακρίνονται οι δύο αναμενόμενες ζώνες, μια στις 3 kbp και μια μεταξύ 5-6 kbp.

Διαπιστώνεται ότι και οι δύο αποικίες, 1 και 5, φέρουν τον επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα attL1-hCas9-attL2, καθώς εμφανίστηκαν οι αναμενόμενες ζώνες των τμημάτων 2.514bp και 5.031bp στις 3 kbp και μεταξύ 5 και 6 kbp αντίστοιχα. Όσον αφορά τα δείγματα control, δηλαδή το απομονωμένο πλασμίδιο των αποικιών 1 και 5 που δεν έχει υποστεί πέψη, εμφανίζονται τρεις ζώνες. Η πιο έντονη, μεταξύ 5 και 6 kbp, αντιπροσωπεύει ολόκληρο το πλασμίδιο των 7.545bp, το οποίο, ωστόσο, λόγω της κυκλικής του μορφής δεν εμφανίζεται στο πραγματικό ύψος μεταξύ 6 και 8 kbp. Οι άλλες δύο ζώνες που φαίνονται πιο αχνά οφείλονται στις δευτερογενείς διαμορφώσεις

που παίρνει οποιοδήποτε πλασμίδιο. Εφόσον διαπιστώθηκε η ταυτότητα των αποικιών 1 και 5, αποθηκεύτηκαν με τη μορφή βακτηριακών glycerol stocks στους -80°C.

Αντίδραση ανασυνδυασμού LR (attL x attR)

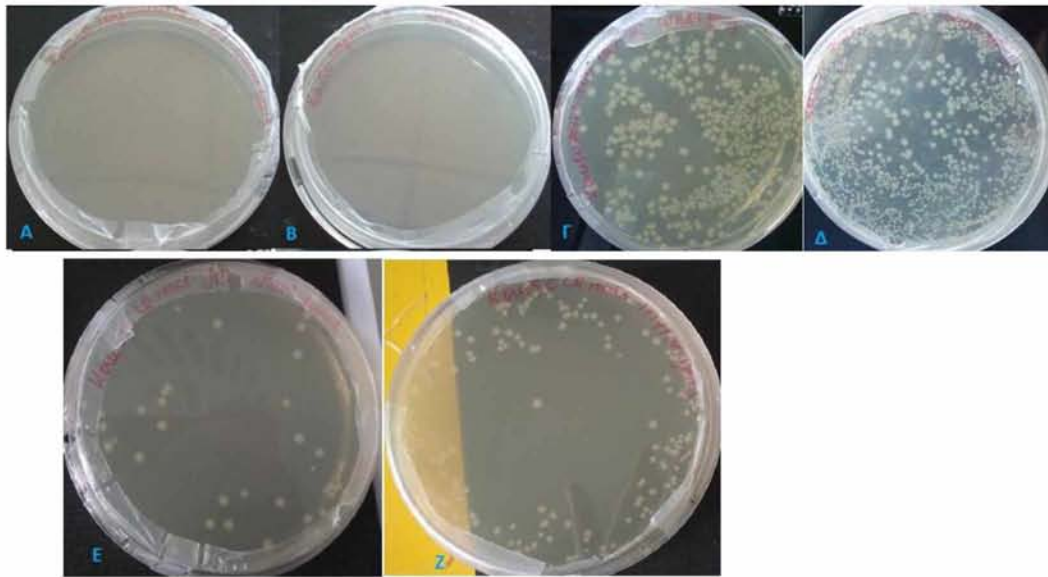


Εικόνα 21. Αντίδραση ανασυνδυασμού LR

Η αντίδραση ανασυνδυασμού LR (attL x attR), επιτεύχθηκε με την, *in vitro*, ανάμειξη των εξής συστατικών: α) το πλασμίδιο attL1-hCas9-attL2 (7.545bp) που αποτελεί προϊόν της αντίδρασης ανασυνδυασμού BP, β) το πλασμίδιο pUB-GWS-Hyg (12.063bp) που φέρει τον υποκινητή του γονιδίου της ουβικουιτίνης (pUB500i) και το γονίδιο αυτοκτονίας ccdB πλαισιωμένο από τις θέσεις ανασυνδυασμού attR1 και attR2 και γ) το μίγμα των πρωτεϊνών ανασυνδυασμού LR Clonase™ enzyme mix. Το κύριο προϊόν της αντίδρασης LR είναι το πλασμίδιο pUB500i-hCas9 (14.583bp) που φέρει τα εξής σημαντικά στοιχεία: α) το γονίδιο της hCas9 πλαισιωμένο από τις θέσεις ανασυνδυασμού attB1 και attB2, β) τον υποκινητή pUB500i που καθορίζει τα επίπεδα έκφρασης της hCas9. Το πλασμίδιο που φέρει τις θέσεις attP1 και attP2 θεωρείται παραπροϊόν. Για τον έλεγχο της επιτυχίας της αντίδρασης και την επιλογή του επιθυμητού πλασμιδιακού φορέα pUB500i-hCas9, ποσότητα του προϊόντος της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό δεκτικών κυττάρων *E. coli* στέλεχος DH5a.

- Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pENTR-GUS στη θέση του attL1-hCas9-attL2. Ο φορέας αυτός περιέχει το γονίδιο gus (β-glucuronidase ή β-γλυκουρονιδάση) πλαισιωμένο από τις θέσεις ανασυνδυασμού attL1 και attL2.

Ποσότητα των αντιδράσεων ανασυνδυασμού LR χρησιμοποιήθηκε για τον μετασχηματισμό βακτηρίων *E. coli* στέλεχος DH5a με τη μέθοδο του θερμικού shock (heatshock). Μετασχηματισμένα βακτήρια επιστρώθηκαν σε τρυβία LB με αντιβιοτικό καναμυκίνη 50μg/ml. Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων στους 37°C για 18 ώρες σε στατικό επωαστήρα (Εικόνα 22).



Εικόνα 22. Ανάπτυξη μετασχηματισμένων αποικιών με το προϊόν της αντίδρασης ανασυνδυασμού LR σε θρεπτικό LB με αντιβιοτικό καναμυκίνη 50µg/ml, έπειτα από επώαση των τρυβλίων στους 37°C για 18 ώρες

A) Αρνητικό control: επίστρωση αραιωμένου διαλύματος μη μετασχηματισμένων βακτηρίων. B) Αρνητικό control: επίστρωση συμπυκνωμένου διαλύματος μη μετασχηματισμένων βακτηρίων. Γ) Θετικό control: επίστρωση αραιωμένου διαλύματος μετασχηματισμένων βακτηρίων. Δ) Θετικό control: επίστρωση συμπυκνωμένου διαλύματος μετασχηματισμένων βακτηρίων. E) Επίστρωση αραιωμένου διαλύματος μετασχηματισμένων βακτηρίων με το προϊόν της αντίδρασης ανασυνδυασμού LR του attL1-hCas9-attL2. Z) Επίστρωση συμπυκνωμένου διαλύματος μετασχηματισμένων βακτηρίων με το προϊόν της αντίδρασης ανασυνδυασμού LR του attL1-hCas9-attL2.

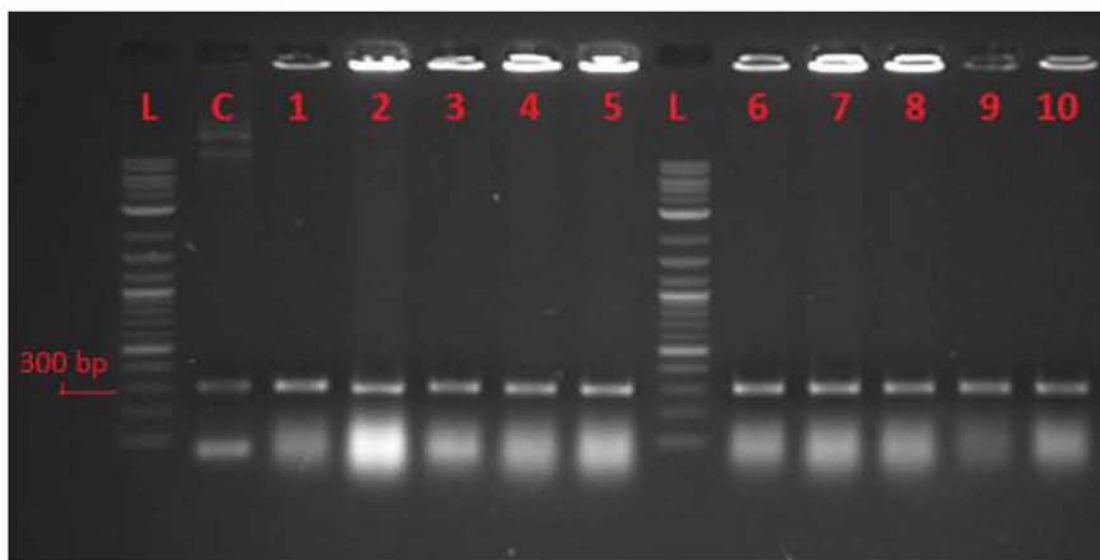
Στα τρυβλία με το αρνητικό control δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη αποικιών, επιβεβαιώνοντας ότι το συγκεκριμένο στέλεχος δεν εμφανίζει ενδογενή ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη και οι αποικίες που αναπτύχθηκαν στα άλλα τρυβλία δεν αποτελούν επιμόλυνση.

Στα τρυβλία της αντίδρασης ανασυνδυασμού LR θετικού control παρατηρήθηκε σημαντική ανάπτυξη αποικιών, όπως και σε αυτά της αντίδρασης ανασυνδυασμού LR του πλασμιδίου attL1-hCas9-attL2.

Συγκρίνοντας τον αριθμό των αποικιών που αναπτύσσονται στα τρυβλία μεταξύ των δύο αντιδράσεων ανασυνδυασμού LR γίνεται αντιληπτό ότι η απόδοση της αντίδρασης εξαρτάται κατά πολύ από το μέγεθος της αλληλουχίας που ανταλλάσσεται. Το γονίδιο της hCas9 αποτελείται από 4.140bp ενώ αυτό της β-γλυκουρονιδάσης από 1.811bp. Επίσης, παρατηρώντας τον αριθμό των αποικιών στα τρυβλία μεταξύ των δύο αντιδράσεων ανασυνδυασμού LR και BP συνάγεται ότι η

απόδοση της αντίδρασης επηρεάζεται από τη φύση των αντιδρώντων πλασμιδίων, το μέγεθος τους και το μέγεθος της αλληλουχίας που ανταλλάσσεται.

Όπως έγινε κατανοητό και στην περίπτωση της αντίδρασης ανασυνδυασμού BP, είναι απαραίτητο να ταυτοποιηθούν οι αποικίες. Επιλέχθηκαν δέκα αποικίες, πέντε από κάθε πιάτο. Χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών hCas9 2f και hCas9 2r για την ενίσχυση τμήματος 290bp του γονιδίου της hCas9. Ως θετικό control χρησιμοποιήθηκε απομονωμένο pK7WGF2::hCas9. Η μεταφορά της κάθε εξεταζόμενης αποικίας σε νέο τρυβλίο LB με το ίδιο αντιβιοτικό έγινε για τη φύλαξη της αποικίας για μελλοντική χρήση. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων ενίσχυσης σε πηκτή αгарόζης 1% (Εικόνα 23).

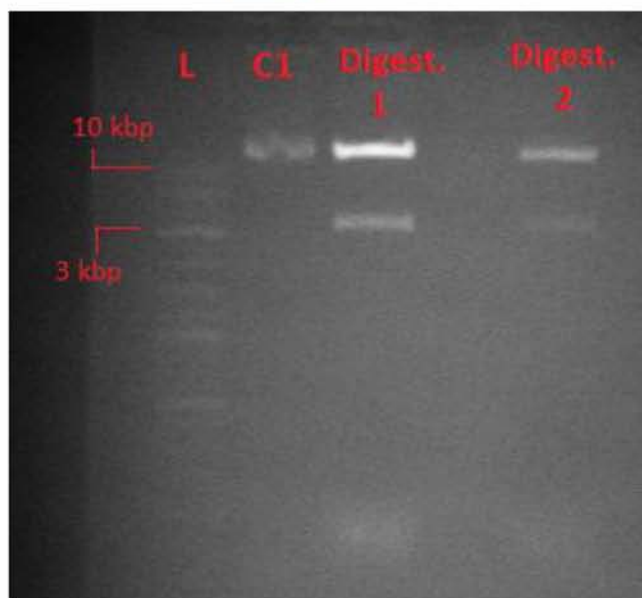


Εικόνα 23. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων ενίσχυσης της colony PCR της αντίδρασης ανασυνδυασμού LR σε πηκτή αгарόζης 1%

Το ζεύγος εκκινητών hCas9 2f και hCas9 2r χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τμήματος 290bp του γονιδίου της hCas9. L: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους, C: απομονωμένο pK7WGF2::hCas9 ως θετικό control, 1 έως 10: αποικίες 1 έως 10 αντίστοιχα. Διακρίνεται η αναμενόμενη ζώνη των 300bp στο θετικό control και σε όλες τις αποικίες.

Φαίνεται ότι ενισχύθηκε το επιθυμητό κομμάτι της hCas9 και στις δέκα αποικίες και για αυτό παρατηρείται η ζώνη στις 300bp. Επιπροσθέτως, στο νέο τρυβλίο LB με καναμυκίνη, όπου είχαν μεταφερθεί οι αποικίες για τη διατήρησή τους, παρατηρήθηκε ικανοποιητική ανάπτυξη και των δέκα. Αν και από τα παραπάνω συνάγεται ότι και οι δέκα αποικίες φέρουν το επιθυμητό πλασμίδιο pUB500i-hCas9 που προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη, ακολούθησε και μια πέψη με ένζυμα περιορισμού.

Για την ταυτοποίηση των αποικιών 1 και 2 ακολούθησε απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση χωρίς kit (miniprep). Η πέψη των απομονωμένων πλασμιδίων των αποικιών 1 και 2 έγινε με το ένζυμο SacI, το οποίο αναγνωρίζει και κόβει τον φορέα σε δύο θέσεις, μια εντός του γονιδίου της hCas9 και μια εκτός. Τα τμήματα που δημιουργούνται έχουν μέγεθος 11.689bp και 2.894bp. Για τον έλεγχο του αριθμού και του μεγέθους των τμημάτων ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1% (Εικόνα 24).



Εικόνα 24. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης πλασμιδιακού DNA που προέρχεται από τις αποικίες 1 και 2 της αντίδρασης ανασυνδυασμού LR σε πηκτή αгарόζης 1%

Το SacI αναγνωρίζει και κόβει δύο φορές το φορέα pUB500i-hCas9 (14.583bp) αφήνοντας δύο τμήματα των 11.689bp και 2.894bp. L: μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους, C1: απομονωμένο πλασμίδιο της αποικίας 1 που δεν έχει κοπεί, Digested1: απομονωμένο πλασμίδιο της αποικίας 1 που έχει κοπεί, Digested 2: απομονωμένο πλασμίδιο της αποικίας 2 που έχει κοπεί. Διακρίνεται μια ζώνη πάνω από τις 10 kbp στο δείγμα control, που αντιπροσωπεύει ολόκληρο το φορέα. Στα προϊόντα πέψης διακρίνονται οι δύο αναμενόμενες ζώνες, μια στις 3 kbp και μια πάνω από τις 10 kbp.

Διαπιστώνεται ότι και οι δύο αποικίες, 1 και 2, φέρουν τον επιθυμητό πλασμιδιακό φορέα pUB500i-hCas9, καθώς εμφανίστηκαν οι αναμενόμενες ζώνες των τμημάτων 2.894bp και 11.689bp στις 3 kbp και πάνω από τις 10 kbp αντίστοιχα. Εφόσον διαπιστώθηκε η ταυτότητα των αποικιών 1 και 2, αποθηκεύτηκαν με τη μορφή βακτηριακών glycerol stocks στους -80°C.

Συζήτηση-Μελλοντικοί στόχοι

Τα τριτερπένια, μολονότι κατηγοριοποιούνται ως δευτερογενείς μεταβολίτες και άρα θεωρούνται έμμεσα απαραίτητα για την ανάπτυξη των φυτών, φαίνεται ότι εμπλέκονται σε πολύ σημαντικές διαδικασίες. Οι πτυχές αυτής της εμπλοκής δεν έχουν ακόμη ξεκαθαριστεί. Αυτό αληθεύει ιδιαίτερα στην περίπτωση της β-αμυρίνης και του γονιδίου *AMY2*, που εκφράζει τη συνθάση μικτής δράσης της β-αμυρίνης στο φυτό *L. japonicus*. Αν και πρωτοανακαλύφθηκε το 2003 (Iturbe-Ormaetxe et al. 2003), υπάρχουν ακόμη αμφιβολίες για το ρόλο του και την ταυτότητα των μεταβολιτών του. Ο βασικός περιορισμός είναι η έλλειψη ενός σταθερού μεταλλάγματος στο οποίο το γονίδιο να μην εκφράζεται. Ο στόχος της εργασίας ήταν η προετοιμασία ενός λειτουργικού συστήματος CRISPR/Cas9, το οποίο στο άμεσο μέλλον θα χρησιμοποιηθεί για τη στοχευμένη αποσιώπηση του γονιδίου *AMY2*.

Το πρώτο μέρος της εργασίας αφορούσε την εύρεση εξειδικευμένων guide RNAs που να στοχεύουν την κωδική περιοχή του γονιδίου. Ωστόσο, αυτό ήταν αδύνατο λόγω της μεγάλης ομολογίας μεταξύ κωδικής αλληλουχίας *AMY2* και *AMY1*. Τελικά σχεδιάστηκαν δύο guide RNAs, 1 και 2, που να στοχεύουν σε δυο διαδοχικά ιντρόνια του *AMY2*, αποσκοπώντας στην παραγωγή δύο σύμπλοκων, hCas9/sgRNA1 και hCas9/sgRNA2, τα οποία θα δημιουργήσουν ταυτόχρονα δύο δίκλωνες ρήξεις εκατέρωθεν του εξονίου 10. Το τμήμα που θα αποκοπεί υπολογίζεται κοντά στις 300 bp συμπεριλαμβανομένου και της περιοχής του εξονίου. Η θραύση θα επιδιορθωθεί μερικώς μέσω του μηχανισμού NHEJ. Η αφαίρεση του εξονίου πολύ πιθανώς να διαταράξει το αναγνωστικό πλαίσιο και να οδηγήσει στην παραγωγή μιας πρωτεΐνης ασυνήθιστα μικρής ή ασυνήθιστα μεγάλης. Μια τέτοια πρωτεΐνη θα έχει σίγουρα μειωμένη δραστηριότητα, εξαιτίας του αφύσικου μεγέθους και της έλλειψης του μοτίβου DCTAE του καταλυτικού κέντρου της.

Η στόχευση ιντρονίων ως κύρια τακτική μεταλλαξιγένεσης έχει δοκιμαστεί σε φυτά (Li, JunMeng, Li, and Gao 2019). Η συγκεκριμένη ομάδα ανέπτυξε ένα πρωτόκολλο αντικατάστασης γονιδίων μέσω της χρήσης δύο sgRNAs που αναγνωρίζουν ιντρόνια. Επιπλέον, σύμφωνα με αυτή την τακτική, εκτός από την αποκοπή του εξονίου υπάρχουν και οι εξής άλλες πιθανότητες: μονή θραύση ή διπλή θραύση και επιδιόρθωση μέσω προσθήκης ή διαγραφής νουκλεοτιδίων στο σημείο θραύσης, αναστροφή του εξονίου ή ακόμα και διπλασιασμός του.

Όσον αφορά τη μη ειδική στόχευση, το γονίδιο *AMY2*-like αποτελεί στόχο και των δύο guide RNAs. Όμως πρόκειται για ψευδογονίδιο, άρα η μετάλλαξη του δε θα επηρεάσει το φαινότυπο

του φυτού. Για τις υπόλοιπες επιδράσεις μη ειδικής στόχευσης σε κωδικές περιοχές γονιδίων είναι μικρή η πιθανότητα μετάλλαξης λόγω των πολλών αναντιστοιχιών. Παρόλα ταύτα, κατά τη μεταλλαξιγένεση του *AMY2* θα παραχθούν ανεξάρτητες μεταλλαγμένες σειρές φυτών. Εφόσον διαπιστωθεί η αποκοπή του εξονίου 10, υπάρχει η δυνατότητα ελέγχου των προβλεπόμενων μη ειδικών στόχων για μεταλλάξεις. Τέλος, ακόμη και αν υπάρχουν μεταλλάξεις της μη ειδικής στόχευσης, ο κοινός φαινότυπος των διαφορετικών μεταλλαγμένων φυτών θα οφείλεται αποκλειστικά στην αποσιώπηση του *AMY2*.

Κάθε guide RNA κλωνοποιήθηκε στον φορέα p1 sgRNA acceptor στη θέση μεταξύ του υποκινητή LjU6 και του gRNA scaffold, αν και μόνο η μια κατασκευή (p::sgRNA2) επιβεβαιώθηκε. Σχετικά με τον υποκινητή U6 του *L. japonicus*, φαίνεται ότι τα επίπεδα της μεταγραφικής του δραστηριότητας είναι ικανοποιητικά (Kumar and Jain 2015). Από την άλλη μεριά, έχει φανεί ότι η δραστηριότητα του υποκινητή της hCas9, CaMV 35S, δεν είναι επαρκής στο φυτό *L. japonicus*.

Το δεύτερο μέρος, λοιπόν, της εργασίας αφορούσε την αντικατάσταση του CaMV 35S με τον pUB500i. Πρόκειται για μια τροποποιημένη μορφή του υποκινητή του γονιδίου της ουβικουιτίνης LjUBQ1, η οποία έχει φανεί ότι παρουσιάζει καλύτερη μεταγραφική δραστηριότητα σε φύλλα, βλαστό, ρίζα και φυμάτια. Ο pUB500i εντοπίζεται στο φορέα pUB-GWS-Hyg. Καθοδικά υπάρχει η κασέτα attR1-ccdB-attR2, η οποία χρησιμοποιείται για την ένθεση οποιουδήποτε γονιδίου με attL άκρα μέσω της αντίδρασης ανασυνδυασμού LR. Εφόσον ο διαθέσιμος φορέας pK7WGF2::hCas9 φέρει τη hCas9 με attB άκρα, προηγήθηκε μια αντίδραση ανασυνδυασμού BP.

Η πορεία μεταλλαξιγένεσης του *AMY2* δε σταματάει εδώ. Χρειάζεται οι κατασκευές να επιβεβαιωθούν με αλληλούχιση. Στο μέλλον πρέπει να ελεγχθεί η λειτουργικότητα του συστήματος και *in vivo*. Το παρόν πλάνο περιλαμβάνει την εισαγωγή των φορέων σε τρεις ξεχωριστές καλλιέργειες *Agrobacterium rhizogenes*, με τις οποίες θα μολυνθούν ρίζες φυτών *L. japonicus*. Οι χημαιρικές ρίζες φυτών θα ελεγχθούν για την απουσία του εξονίου 10. Τελικός στόχος είναι η δημιουργία σταθερά μεταλλαγμένων σειρών στις οποίες το *AMY2* θα έχει αποσιωπηθεί. Τα μεταλλάγματα αυτά θα χρησιμοποιηθούν για την περαιτέρω ανάλυση του γονιδίου.

Υλικά και μέθοδοι

Σχεδιασμός των sgRNAs με τη βοήθεια του CRISPR-P 2.0

Ένα σύστημα CRISPR/Cas9 βασίζεται στην ειδίκευση του sgRNA για την ακριβή και αποτελεσματική τροποποίηση μιας αλληλουχίας-στόχου. Κάθε sgRNA αποτελείται από: το crRNA (αλλιώς guide RNA) που είναι συμπληρωματικό με την αλληλουχία-στόχο και το tracrRNA ή αλλιώς gRNA scaffold, η αλληλουχία του οποίου είναι σταθερή σε κάθε sgRNA. Καθοδικά της αλληλουχίας-στόχου στο γονιδίωμα υπάρχει η αλληλουχία PAM, η ύπαρξη της οποίας είναι απαραίτητη για να μπορέσει να κόψει τις δύο αλυσίδες το σύμπλοκο της Cas9-sgRNA. Για την εύρεση όλων των θέσεων PAM και άρα των πιθανών στόχων χρησιμοποιήθηκε το online εργαλείο σχεδιασμού των guide RNAs, CRISPR-P 2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR2/CRISPR>).

Διαδικασία

Η αναζήτηση των κατάλληλων guide RNAs ξεκίνησε με την εύρεση της γονιδιωματικής αλληλουχίας του *AMY2* (GenBank accession number: AF478455_1) που είναι διαθέσιμη στο Lotus Base, την πύλη πληροφοριών για το φυτό *L. japonicus* (<https://lotus.au.dk/>). Ο κωδικός του *AMY2* για το Lotus Base είναι Lj3g3v1983420.2. Το μέγεθος της γονιδιωματικής αλληλουχίας είναι 10.291 bp, πολύ μεγάλο για να το δεχθεί εξ ολοκλήρου το CRISPR-P 2.0. Για αυτό χωρίστηκε στα δύο –οι 5.000 bp από τη μεριά του 3'UTR και οι υπόλοιπες 5.291 bp. Με την υποβολή της κάθε γονιδιωματικής περιοχής για την αναζήτηση των πιθανών στόχων επιλέχθηκαν οι εξής παράμετροι: *L. japonicus* (v3.0) ως το γονιδίωμα αναφοράς του είδους *L. japonicus*, ο υποκινητής U6 ως τον υποκινητή έκφρασης του sgRNA, το gRNA scaffold του οργανισμού *Streptococcus pyogenes*, 20-νουκλεοτίδια ως το μέγεθος του guide RNA και 5'NGG3' ως η αλληλουχία PAM που αναγνωρίζεται από την Cas9 του οργανισμού *Streptococcus pyogenes*, με N οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο. Από τα προτεινόμενα guide RNAs επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση αυτά που προβλέπεται να έχουν μεγάλο βαθμό εξειδικευμένης στόχευσης (υψηλό on-score, πάνω από 0,6). Σχετικά με την ικανότητα μη ειδικής στόχευσης (off-target effects), θεωρήθηκαν ανεκτά μόνο αυτά με τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: α) στόχευση κωδικής περιοχής άλλου γονιδίου με αρκετές αναντιστοιχίες, β) στόχευση διαγονιδιακής περιοχής γ) στόχευση ιντρονίου και δ) στόχευση κωδικής περιοχής χωρίς αναντιστοιχίες ενός ψευδογονιδίου.

Το Lotus Base χρησιμοποιήθηκε, επιπλέον, για την εύρεση της κωδικής αλληλουχίας των γονιδίων *AMY1*, *AMY2*, *AMY2-like*. Οι κωδικοί των *AMY1* και *AMY2-like* είναι Lj3g3v2027430.1 και Lj3g3v2015970.1 αντίστοιχα. Όλες οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αλλά και οι συντεταγμένες προέρχονται από το Lotus Base. Η στοίχιση των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Παραγωγή των guide RNAs

Η σύνθεση του κάθε guide RNA συνέβει με τη μορφή δύο μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδικών αλυσίδων forward και reverse που είναι συμπληρωματικές και φωσφορυλιωμένες στο 5' άκρο.

Όνομα ολιγονουκλεοτ.	Αλληλουχία 5'→3'	Tm[°C]	%GC	Όνομα Guide RNA	Στόχος AMY2
AMY2gRNA1F	[PHO] TTCCACTGCATAG AAAAGCCATAGGG	63,2	46,2	Guide 1	Ιντρόνιο 9
AMY2gRNA1R	[PHO] AACCCCTATGGC TTTCTATGCAGTG	63,2	46,2		
AMY2gRNA2F	[PHO] TTCTGACATCTCG AGTTTCACATTGG	61,6	42,3	Guide 2	Ιντρόνιο 10
AMY2gRNA2R	[PHO] AACCCAATGTGAAA CTCGAGATGTCA	61,6	42,3		

Πίνακας 1. Στοιχεία παραγωγίας των guide RNAs με τη μορφή μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων

Καταγράφεται το όνομα, η αλληλουχία κάθε ολιγονουκλεοτιδίου με φορά 5'→3', η τιμή Tm και το ποσοστό GC. Ο συμβολισμός [PHO] αντιπροσωπεύει την τροποποίηση κάθε ολιγονουκλεοτιδίου, δηλαδή τη φωσφορυλίωση του 5' άκρου. Με bold είναι επισημασμένα τα τρία προεξέχοντα μη συμπληρωματικά νουκλεοτίδια. Το γράμμα F στο όνομα των ολιγονουκλεοτιδίων υποδεικνύει την αλυσίδα forward που έχει την ίδια αλληλουχία με το παραγόμενο guide RNA (με τη μόνη διαφορά ότι αντί για U υπάρχει T), ενώ το R υποδεικνύει την αλυσίδα reverse που είναι η μήτρα του παραγόμενου guide RNA. Τα ολιγονουκλεοτίδια Amy2gRNA1F και Amy2gRNA1R συνθέτουν το guide RNA 1 που στοχεύει το ιντρόνιο 9 του *AMY2* και τα Amy2gRNA2F και Amy2gRNA2R το guide RNA 2 που στοχεύει το ιντρόνιο 10.

Δημιουργία συγκεντρώσεων stock και working των guide RNAs

Τα τέσσερα ολιγονουκλεοτίδια που φαίνονται στον πίνακα 2 παραλήφθηκαν με τη μορφή σκόνης (λυοφιλιωμένη μορφή). Με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας αποστειρωμένου ddH₂O και καλής ανακίνησης η συγκέντρωση του κάθε ολιγονουκλεοτιδίου έγινε 100pmol/μl (stock concentration). Για τις ανάγκες των περισσότερων πειραμάτων απαιτείται η συγκέντρωση των ολιγονουκλεοτιδίων να είναι 10pmol/μl ή 10μM (working concentration). Έτσι ακολούθησε μια αραίωση 1/10 σε τελικό όγκο 200μl. Στη συνέχεια, φυλάχθηκαν στους -20°C.

Όνομα ολιγονουκλεοτ.	Ποσότητα ddH ₂ O (μl) για 100pmol/μl
AMY2gRNA1F	326
AMY2gRNA1R	321
AMY2gRNA2F	346
AMY2gRNA2R	194

Πίνακας 2.

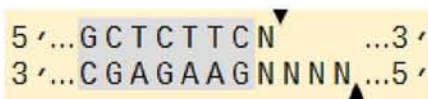
Υβριδοποίηση των συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων

Το κάθε ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων forward και reverse πρέπει να υβριδοποιηθεί. Αρχικά, υπολογίστηκαν σε πόσα ng αντιστοιχούν τα 10pmol κάθε μονόκλωνης αλυσίδας. Μέσω του online εργαλείου NEBioCalculator™v1.10.0 υπολογίστηκαν ως 85ng. Επομένως, η συγκέντρωση των μονόκλωνων αλυσίδων είναι περίπου 85ng/μl. Για την κάθε αντίδραση υβριδοποίησης προστέθηκαν σε ένα σωληνάριο PCR ισομοριακές ποσότητες 9μl (765ng) του forward, 9μl (765ng) του reverse και 2μl του ρυθμιστικού διαλύματος της λιγάσης T4. Έπειτα από καλή ανάμειξη οι αντιδράσεις επώαστηκαν ως εξής:

1. Επώαση στους 95°C για 5 λεπτά στο μηχάνημα της PCR. Η υψηλή θερμοκρασία “σπάει” όλους τους δεσμούς υδρογόνου καταργώντας τις δευτεροταγείς δομές εντός του κάθε ολιγονουκλεοτιδίου.
2. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Η σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας επιτρέπει την ανάπτυξη των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών αλληλουχιών.
3. Επανάληψη των βημάτων 1 και 2 άλλες δύο φορές.
4. Τοποθέτηση των σωληναρίων της PCR με τα πλέον δίκλωνα μόρια DNA στον πάγο.

Αντίδραση πέψης και σύνδεσης μορίων DNA σε ένα σωλήνα

Το πρωτόκολλο είναι προσαρμοσμένο από τη μέθοδο κλωνοποίησης Golden Gate, η οποία βασίζεται στη χρήση των ενδονουκλεασών περιορισμού τύπου IIS. Χαρακτηριστικό αυτών των ενζύμων είναι ότι η αλληλουχία αναγνώρισης και κοπής δεν ταυτίζονται. Ο φορέας κλωνοποίησης είναι ο p1 sgRNA acceptor στον οποίο υπάρχουν δύο θέσεις αναγνώρισης του ενζύμου SapI. Το ένζυμο αναγνωρίζει την παρακάτω αλληλουχία και κόβει εκεί που δείχνουν τα βέλη.



Το τμήμα που θα αποκοπεί από το φορέα είναι μεγέθους 23 bp. Τα άκρα που μένουν είναι συμπληρωματικά με τα προεξέχοντα άκρα των δίκλωνων guide RNAs.

Διαδικασία

Αρχικά, υπολογίστηκαν πόσα ng του ενθέματος θα προστεθούν σε 50ng του φορέα. Η προτεινόμενη μοριακή αναλογία ενθέματος:φορέα είναι 2:1. Σύμφωνα με τον τύπο

$$\text{ng of insert} = \frac{\text{ng vector} * \text{kb insert size}}{\text{kb vector size}} * \frac{\text{insert}}{\text{vector}}, \text{ όπου insert/vector η αναλογία 2/1,}$$

αντιστοιχούν 0,5ng του ενθέματος guide 1 και guide 2. Με βάση αυτήν την ποσότητα έγιναν και οι ανάλογες αραιώσεις. Ακολουθούν τα προστεθμένα αντιδραστήρια και οι συνθήκες επώασης των αντιδράσεων.

Φορέας: p1 sgRNA acceptor	50ng
Ένθεμα: guide 1 ή guide 2	0,5-1ng
SapI	10U (1μl)
Cutsmart	1x (1μl)
Λιγάση T4	100U (1μl)
Ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης T4	1x (1μl)
ddH ₂ O	Μέχρι τα 10μl

Πίνακας 3. Αντίδραση πέψης-λιγάσης

1. Επώαση στους 40°C για 10 λεπτά. Στο στάδιο αυτό δρα το SapI κόβοντας το φορέα p1 sgRNA acceptor σε δύο σημεία.
2. Επώαση στους 16°C για 10 λεπτά. Η λιγάση T4 συνδέει το ένθεμα με το φορέα δημιουργώντας φωσφοδιεστερικούς δεσμούς.
3. Επανάληψη των βημάτων 1 και 2 άλλες δύο φορές. Η δυνατότητα αυτή υπάρχει, διότι ο ανασυνδυασμένος φορέας δε φέρει πλέον τις θέσεις αναγνώρισης του SapI.
4. Επώαση στους 50°C για 10 λεπτά. Στο στάδιο αυτό ο φορέας γίνεται γραμμικός με την δράση του SapI.
5. Απενεργοποίηση ενζύμων στους 80°C για 20 λεπτά.

Τα προϊόντα των αντιδράσεων φυλλάχθηκαν στους -20°C . Την επόμενη μέρα ακολούθησε μετασχηματισμός δεκτικών *E.coli* στέλεχος DH5a με 2μl του προϊόντος κάθε αντίδρασης και επίστρωση των βακτηρίων σε τρυβλία LB με αντιβιοτικό καρμπενικιλίνη 100μg/ml.

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από κύτταρα *Escherichia coli*

Βασίζεται στο γεγονός ότι το χρωμοσωμικό DNA και οι πρωτεΐνες, όταν εκτεθούν σε αλκαλικό περιβάλλον με υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) και κάποιο απορρυπαντικό, θα αποδιαταχθούν. Το ίδιο βέβαια θα συμβεί και με το πλασμιδιακό DNA. Ωστόσο, λόγω του μικρότερου μεγέθους και της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του, όταν στη συνέχεια εκτεθεί σε ένα διάλυμα εξουδετέρωσης, έστω όξινο διάλυμα με οξικό κάλιο (CH_3COOK), θα επαναδιαταχθεί και θα παραμείνει διαλυτοποιημένο. Αντίθετα, το μεγάλο μέγεθος του χρωμοσωμικού DNA και των πρωτεϊνών δεν επιτρέπει την επαναδιάταξη και επαναδιαλυτοποίηση τους, άρα με ένα βήμα φυγοκέντρησης θα απομακρυνθούν.

Στο πλαίσιο των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι απομόνωσης πλασμιδιακού DNA από υγρές καλλιέργειες βακτηρίων *E.coli*.

- I. Μέθοδος αλκαλικής λύσης με το NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) kit της Macherey-Nagel. Πιο συγκεκριμένα,
 - για την απομόνωση του πλασμιδίου pK7WGF2::hCas9 (attB1-hCas9-attB2), χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο: 5.2 Isolation of low-copy plasmid DNA from *E.coli*, καθώς το πλασμίδιο αυτό διατηρείται σε λίγα αντίγραφα μέσα στα βακτήρια DH5a.
 - για την απομόνωση των πλασμιδίων pDONR™207, pUB-GW-Hyg και attL1-hCas9-attL2 χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο: 5.1 Isolation of high-copy plasmid DNA from *E.coli*, καθώς τα πλασμίδια αυτά διατηρούνται σε πολλά αντίγραφα μέσα στα βακτήρια.
- II. Miniprep: μέθοδος απομόνωσης πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας μέσω αλκαλικής λύσης κυττάρων (χωρίς kit).

Υλικά

- Βακτηριακή υγρή καλλιέργεια (5ml)
- Διάλυμα επαναδιαλυτοποίησης P1
50mM Tris, 10mM EDTA, το pH σταθεροποιείται στην τιμή 8 με HCl
- Διάλυμα λύσης P2
200mM NaOH, 1% SDS
- Διάλυμα εξισσορόπησης P3

3M CH₃COOK, το pH σταθεροποιείται στην τιμή 5,5 με παγωμένο οξικό οξύ

- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη 70%
- RNAση (10mg/ml)
- Αποστειρωμένο ddH₂O

Διαδικασία

1. Σε tube των 1,5ml πραγματοποιείται φυγοκέντρωση μικρής ποσότητας βακτηριακής υγρής καλλιέργειας (5ml) στα 10.000g για 30 δευτερόλεπτα. Το υπερκείμενο απορρίπτεται.
2. Επανάληψη του βήματος 1. Εφόσον υπάρχει αρκετή ποσότητα ιζήματος και έχει απομακρυνθεί τελείως το θρεπτικό LB, προχωράμε στο επόμενο βήμα.
3. Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 300μl διαλύματος P1 στο οποίο έχουμε ήδη διαλυτοποιήσει 3μl RNAσης. Η επαναδιαλυτοποίηση γίνεται με πολύ καλή ανακίνηση στο vortex.
 - Αντιστοιχούν 3μl RNAσης ανά δείγμα. Προστίθεται για την αποικοδόμηση του RNA.
 - Τα κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα μικρότερου όγκου, το οποίο είναι συμβατό ως προς το pH με το ακόλουθο διάλυμα.
4. Προσθήκη 300μl διαλύματος P2. Αναποδογυρίζουμε αργά το tube 5-6 φορές, μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές.
 - Το διάλυμα αυτό είναι αλκαλικό και περιέχει SDS, δηλαδή απορρυπαντικό, που οδηγεί στη λύση των κυττάρων και στην απελευθέρωση του πλασμιδίου. Πρωτεΐνες και τυχόν χρωμοσωμικό DNA που έχουν απελευθερωθεί αποδιατάσσονται, όπως και το πλασμίδιο.
5. Προσθήκη 300μl διαλύματος P3. Αναποδογυρίζουμε αργά το tube 3-4 φορές. Δημιουργείται ένα άσπρο ίζημα που αποτελείται από μεμβράνες, πρωτεΐνες και χρωμοσωμικό DNA.
 - Το διάλυμα P3 είναι όξινο, άρα επανέρχεται το pH και επαναδιαλυτοποιείται το πλασμίδιο.
6. Επώαση στον πάγο για 10 λεπτά, για να μειωθεί η θερμοκρασία στο εσωτερικό του tube.
7. Φυγοκέντρωση στα 10.000g για 10 λεπτά. Το ίζημα αποτελείται από μεμβράνες, πρωτεΐνες και χρωμοσωμικό DNA, ενώ το πλασμίδιο βρίσκεται στο υπερκείμενο.
8. Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο tube των 1,5ml.
9. Φυγοκέντρωση στα 10.000g για 2 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα.
10. Μεταφορά του υπερκείμενου σε τελικό tube των 1,5ml.

11. Προσθήκη 600μl ισοπροπανόλης.
12. Φυγοκέντρωση στα 10.000g για 15 λεπτά.
 - Η ισοπροπανόλη δημιουργεί συσσωματώματα με το πλασμίδιο και τα άλατα, τα οποία με φυγοκέντρωση καθιζάνουν.
13. Προσθήκη 500μl παγωμένης αιθανόλης 70%.
14. Φυγοκέντρωση στα 10.000g για 10 λεπτά.
 - Η αιθανόλη απομακρύνει πολλά από τα άλατα που επηρεάζουν την απόδοση πολλών αντιδράσεων.
15. Το υπερκείμενο, δηλαδή η αιθανόλη, απορρίπτεται.
 - Προσπαθούμε σε αυτό το στάδιο να απομακρύνουμε όσο το δυνατόν περισσότερη αιθανόλη, ώστε να μην καθυστερήσουμε στο επόμενο.
16. Ξηραίνουμε το ίζημα, δηλαδή το πλασμίδιο, είτε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, είτε στους 65°C για πέντε λεπτά.
 - Οι παραπάνω χρόνοι είναι ενδεικτικοί. Μας ενδιαφέρει να μην μυρίζει το tube αιθανόλη, διότι μπορεί να επηρεάσει και αυτή με τη σειρά της μελλοντικούς πειραματικούς χειρισμούς μας.
17. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 20-40μl αποστειρωμένου ddH₂O, ξύνοντας με το tip τα τοιχώματα του tube.

Αντίδραση ανασυνδυασμού BP

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε προέρχεται από το εγχειρίδιο χρήσης της εταιρείας Invitrogen.

Η αντίδραση ανασυνδυασμού BP συνέβη μεταξύ των πλασμιδίων pK7WGF2::hCas9 και pDONRTM207. Στο πρώτο βρίσκεται το γονίδιο της hCas9 που περιβάλλεται από τις θέσεις ανασυνδυασμού attB1 και attB2, ενώ στο δεύτερο το γονίδιο αυτοκτονίας ccdB πλαισιωμένο από τις θέσεις attP1 και attP2 (περισσότερες λεπτομέρειες για τους φορείς περιγράφονται στην ενότητα Παράμετροι: Χάρτες πλασμιδιακών φορέων της παρούσας διατριβής). Η αντίδραση καταλύεται από το μίγμα ενζύμων integrase και IHF.

Παράμετροι αντίδρασης

Για να αυξηθεί η απόδοση της αντίδρασης συνίσταται:

- I. Χρήση ισομοριακής ποσότητας των δύο αντιδρώντων πλασμιδιακών φορέων. Για την αντίδραση ανασυνδυασμού BP τελικού όγκου 10μl η βέλτιστη αναλογία είναι: 30fmol του

πλασμιδίου pK7WGF2::hCas9 (14.402bp) και 30fmol του πλασμιδίου pDONR™207 (5.585bp), τα οποία αναλογούν σε 102ng για το pK7WGF2::hCas9 και 259,5ng για το pDONR207, σύμφωνα με τον τύπο

$$\text{ng} = (\text{fmol})(N) \left(\frac{660 \text{ fg}}{\text{fmol}} \right) \left(\frac{1 \text{ ng}}{10^6 \text{ fg}} \right) \quad \text{όπου } N \text{ το μέγεθος του DNA σε bp.}$$

- II. Αύξηση του χρόνου επώασης της αντίδρασης αναλογικά με το μέγεθος του φορέα με τα attB άκρα. Στην περίπτωση αυτή προτείνεται δεκαοχτάωρη επώαση στους 25°C (χρήση επωαστήρα), διότι το μέγεθος του pK7WGF2::hCas9 είναι 14.402bp.
- III. Χρήση πλασμιδίων απομονωμένων με kit.

Υλικά

- attB1-hCas9-attB2 (pK7WGF2::hCas9), απομονωμένο με kit
- pDONR™207, απομονωμένο με kit
- BP Clonase™ enzyme mix
- TE Buffer, pH 8.0 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)
- Proteinase K, 2μg/μl
- pEXP7-tet, 50ng/μl ως θετικό control

Διαδικασία

1. Προσθήκη των παρακάτω συστατικών σε σωλήνα τύπου eppendorf των 1.5ml, σε θερμοκρασία δωματίου:

Αντιδραστήρια	Αντίδραση ανασυνδυασμού BP	Αντίδραση ανασυνδυασμού BP Θετικό control
pK7WGF2::hCas9 φορέας	259,5ng	-
pDONR™ 207 φορέας	102ng	102ng
pEXP- tet (50 ng/μl)	-	100ng (2μl)
TE buffer, (pH 8.0)	μέχρι τα 8μl	μέχρι τα 8μl

Πίνακας 4. Αντίδραση ανασυνδυασμού BP

2. Αφήνεται να ξεπαγώσει στον πάγο το μείγμα ενζύμων-buffer BP Clonase™II για περίπου 2 λεπτά. Ακολουθεί σύντομη ανάδευση του στο vortex εις διπλούν (2 δευτερόλεπτα κάθε φορά).

3. Προσθήκη 2μl του μείγματος BP Clonase™II σε κάθε δείγμα. Ακολουθεί καλή ανάμειξη του μείγματος με πιπετάρισμα.
➤ Το μείγμα BP Clonase™II επιστρέφεται άμεσα στην κατάψυξη.
4. Οι αντιδράσεις επωάζονται στους 25 °C για 18 ώρες.
5. Για την απενεργοποίηση των ενζύμων και τη λήξη της αντίδρασης ακολουθεί προσθήκη 1μl της πρωτεΐνης K, ανάμειξη και επώαση στους 37 °C για 10 λεπτά.
6. Τα δείγματα/προϊόντα της αντίδρασης BP τοποθετούνται στον πάγο ή φυλλάσσονται στο ψυγείο ή την κατάψυξη.
7. Για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της αντίδρασης αλλά και για να επιλεγεί ο σωστός φορέας ακολουθεί μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων *E.coli* με μια μικρή ποσότητα της αντίδρασης και επιλογή των κατάλληλων αποικιών.

Αντίδραση ανασυνδυασμού LR

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε προέρχεται από το εγχειρίδιο χρήσης της εταιρείας Invitrogen.

Η αντίδραση ανασυνδυασμού LR συνέβη μεταξύ των πλασμιδίων attL1-hCas9-attL2 και pUB-GWS-Hyg. Το δεύτερο πλασμίδιο φέρει τον υποκινητή του γονιδίου της ουβικουιτίνης (pUB500i) και το γονίδιο αυτοκτονίας *ccdB* πλαισιωμένο από τις θέσεις attR1 και attR2. Η αντίδραση καταλύεται από το μίγμα ενζύμων integrase, IHF και excisionase.

Παράμετροι αντίδρασης

Για να αυξηθεί η απόδοση της αντίδρασης συνίσταται:

- I. Χρήση ισομοριακής ποσότητας των δύο αντιδρώντων πλασμιδιακών φορέων. Για την αντίδραση ανασυνδυασμού LR τελικού όγκου 10μl η βέλτιστη αναλογία είναι: 20fmol του πλασμιδίου attL1-hCas9-attL2 (7.545bp) και 20fmol του πλασμιδίου pUB-GWS-Hyg (12.063bp), τα οποία αναλογούν σε 92ng για το attL1-hCas9-attL2 και 150ng για το pUB-GWS-Hyg, σύμφωνα με τον τύπο

$$\text{ng} = (\text{fmol})(N) \left(\frac{660 \text{ fg}}{\text{fmol}} \right) \left(\frac{1 \text{ ng}}{10^6 \text{ fg}} \right) \quad \text{όπου } N \text{ το μέγεθος του DNA σε bp.}$$

- II. Αύξηση του χρόνου επώασης της αντίδρασης αναλογικά με το μέγεθος των φορέων. Στην περίπτωση αυτή προτείνεται δεκαοχτάωρη επώαση στους 25°C (χρήση επωαστήρα).
- III. Χρήση πλασμιδίων απομονωμένων με kit.

Υλικά

- attL1-hCas9-attL2, απομονωμένο με kit
- pUB-GWS-Hyg, απομονωμένο με kit
- LR Clonase™ enzyme mix
- TE Buffer, pH 8.0 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)
- Proteinase K, 2μg/μl
- pENTR-gus, 50ng/μl ως θετικό control

Διαδικασία

1. Προσθήκη των παρακάτω συστατικών σε σωλήνα τύπου eppendorf των 1.5ml, σε θερμοκρασία δωματίου:

Αντιδραστήρια	Αντίδραση ανασυνδυασμού LR	Αντίδραση ανασυνδυασμούLR Θετικό control
attL1-hCas9-attL2φορέας	92ng	-
pUB-GWS-Hyg φορέας	150ng	150ng
pENTR-gus (50 ng/μl)	-	100ng (2μl)
TE buffer, (pH 8.0)	μέχρι τα 8μl	μέχρι τα 8μl

Πίνακας 5. Αντίδραση ανασυνδυασμού LR

2. Αφήνεται να ξεπαγώσει στον πάγο το μείγμα ενζύμων-buffer LR Clonase™II για περίπου 2 λεπτά. Ακολουθεί σύντομη ανάδευση του στο vortex εις διπλούν (2 δευτερόλεπτα κάθε φορά).
3. Προσθήκη 2μl του μείγματος LR Clonase™II σε κάθε δείγμα. Ακολουθεί καλή ανάμειξη του μείγματος με πιπετάρισμα.
➤ Το μείγμα LR Clonase™II επιστρέφεται άμεσα στην κατάψυξη.
4. Οι αντιδράσεις επωάζονται στους 25 °C για 18 ώρες.
5. Για την απενεργοποίηση των ενζύμων και τη λήξη της αντίδρασης ακολουθεί προσθήκη 1μl της πρωτεΐνης K, ανάμειξη και επώαση στους 37 °C για 10 λεπτά.
6. Τα δείγματα/προϊόντα της αντίδρασης LR τοποθετούνται στον πάγο ή φυλλάσσονται στο ψυγείο ή την κατάψυξη.

7. Για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της αντίδρασης αλλά και για να επιλεγεί ο σωστός φορέας ακολουθεί μετασχηματισμός δεκτικών βακτηρίων *E.coli* με μια μικρή ποσότητα της αντίδρασης και επιλογή των κατάλληλων αποικιών.

Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* με πλασμιδιακό DNA

Ο βακτηριακός μετασχηματισμός είναι ένα φυσικό φαινόμενο κατά το οποίο συγκεκριμένα βακτήρια μπορούν να δεκτούν “γυμνό” DNA που βρίσκεται στο περιβάλλον τους. Στο εργαστήριο η ικανότητα αυτή αξιοποιείται για την εισαγωγή πλασμιδιακού DNA σε βακτήρια. Ωστόσο, το βακτηριακό είδος που χρησιμοποιείται στην πλειοψηφία των περιπτώσεων (*E.coli*), δεν είναι ικανό από μόνο του να λάβει “γυμνό” DNA. Με την αξιοποίηση πρωτόκολλων που βασίζονται στη χρήση χλωριούχου ασβεστίου (CaCl_2) μπορεί να καταστεί δεκτικό. Ουσιαστικά, το χλωριούχο ασβέστιο διευκολύνει την πρόσδεση του αρνητικά φορτισμένου πλασμιδιακού DNA στους αρνητικά φορτισμένους λιποσακχαρίτες της μεμβράνης μειώνοντας την μεταξύ τους απόσταση.

Υλικά

- Δεκτικά κύτταρα *E.coli*, στέλεχος DH5a
- Πλασμιδιακό DNA
- Τριβλύα με θρεπτικό μέσο LB-άγαρ με κατάλληλο αντιβιοτικό
- Θρεπτικό μέσο LB

Διαδικασία

1. Αφαίρεση των δεκτικών κυττάρων *E.coli* DH5a από τη βαθιά κατάψυξη (-80°C) και άμεση τοποθέτηση τους στον πάγο για να ξεπαγώσουν, χωρίς όμως να παραμείνουν έστω και για λίγο σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Προσθήκη 2-4μl πλασμιδιακού DNA σε 80μl δεκτικών κυττάρων *E.coli* DH5a.
3. Ανάμειξη μείγματος κυττάρων-DNA και επώαση στον πάγο για 30 λεπτά.
4. Ακολουθεί θερμικό shock (heatshock) στους 42°C για 55 δεύτερα σε υδατόλουτρο.
 - Η απότομη εναλλαγή θερμοκρασιών δημιουργεί πόρους στα τοιχώματα των βακτηρίων, ώστε να μπορέσει να εισέλθει το πλασμίδιο.
5. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 5 λεπτά.
 - Στο στάδιο αυτό κλείνουν οι πόροι των τοιχωμάτων, αφού έχει ήδη εισαχθεί το πλασμίδιο.
6. Σε στείρες συνθήκες, προσθήκη 1ml θρεπτικού μέσου LB, το οποίο έχει προθερμανθεί στους 37° .

7. Ανάμειξη μείγματος και επώαση στους 37 °C για 45 λεπτά.
 - Στην παρούσα φάση η επώαση επιτρέπει στα βακτήρια να ανακάμψουν από το shock που υπέστησαν και να εκφράσουν το γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά που εντοπίζεται στο σκελετό του ληφθέντος πλασμιδίου.
8. Ανακίνηση μείγματος κυττάρων-θρεπτικού LB και επίστρωση 100μl του μείγματος σε τρυβλίο που περιέχει θρεπτικό LB-άγαρ και το κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των επιθυμητών για το πείραμα κλώνων.
 - Τα 100μl στην πλειοψηφία τους αποτελούνται από το θρεπτικό μέσο LB και λίγα κύτταρα. Μπορούμε να παραλείψουμε το βήμα αυτό και να προχωρήσουμε κατευθείαν στο επόμενο.
9. Φυγοκέντρηση του μείγματος κυττάρων-θρεπτικού LB στα 10.000g για 30 δευτερόλεπτα και αφαίρεση 800-900μl του υπερκείμενου (θρεπτικό LB). Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος (κύτταρα) στην υπολειπόμενη ποσότητα θρεπτικού LB.
10. Επίστρωση 100μl του μείγματος σε τρυβλίο που περιέχει θρεπτικό LB-άγαρ και το κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των επιθυμητών για το πείραμα κλώνων.
11. Επώαση των τρυβλίων στους 37 °C για 16 ώρες.

Επαλήθευση αποικιών με τη μέθοδο της PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction ή απλώς PCR) είναι μια μέθοδος ενζυματικής ενίσχυσης τμημάτων DNA *in vitro*, χωρίς δηλαδή τη χρήση ζωντανών οργανισμών. Βασίζεται στην ικανότητα της πολυμεράσης του DNA να συνθέτει ένα νέο κλώνο DNA συμπληρωματικό προς τον κλώνο-εκμαγείο του υπάρχοντος δίκλωνου μορίου, με την προϋπόθεση ότι υπάρχει μια ελεύθερη 3'-OH ομάδα. Η ενίσχυση μιας περιοχής γίνεται με τη χρήση δύο ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητές), το καθένα συμπληρωματικό με μια από τις δύο αλυσίδες και με αντίθετο προσανατολισμό προς το εσωτερικό της περιοχής αυτής. Μια τυπική αντίδραση PCR αποτελείται από τη μήτρα DNA που περιέχει την περιοχή προς ενίσχυση, μια θερμοανθεκτική πολυμεράση του DNA, τους εκκινητές, ένα ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης με ιόντα Mg^{2+} , δεοξυριβονουκλεοτίδια και νερό. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκυκλοποιητή και απαιτεί αρκετούς κύκλους για να ενισχυθεί σε ικανοποιητικό βαθμό το ανάλογο τμήμα. Ένας πλήρης κύκλος περιλαμβάνει την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 95°C, την υβριδοποίηση των εκκινητών στη μήτρα σε θερμοκρασία που ορίζεται ως πέντε βαθμοί χαμηλότερα από την ελάχιστη τιμή T_m και την επιμήκυνση των εκκινητών στους 72°C.

Στην εργασία αυτή η μέθοδος της PCR χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των επιθυμητών ανασυνδυασμένων πλασμιδίων.

Εκκινητής	Αλληλουχία 5' → 3'
AMY2guideRNA1R	AACCCCTATGGCTTTTCTATGCAGTG
AMY2guideRNA2R	AACCCAATGTGAAACTCGAGATGTCA
LjU6p1f	tttggtctcaacatGGAGAATCTTTGAGAGGGAATAAAAG
LjU6p3r	tttggtctcaacaacattgctcttcaGAACCTTGTTGCTGACTATT

Πίνακας 6. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της PCR

- Με πεζά γράμματα αντιπροσωπεύονται τα νουκλεοτίδια που δεν είναι συμπληρωματικά και προεξέχουν. Η παρουσία τους εξυπηρετεί τον σκοπό άλλης εργασίας.

Διαδικασία

Όλοι οι χειρισμοί γίνονται σε πάγο. Σε σωληνάρια της PCR προστίθενται τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση	Τελικός όγκος αντίδρασης 20μl
Αποστειρωμένο ddH ₂ O	-	10,92
Ρυθμιστικό διάλυμα KapaTaq 10X με ιόντα Mg ²⁺	1X	2
dNTPs (10mM)	200μM	0,4
Μήτρα DNA (1ng/μl)	5ng σε 20μl	5
FWD (10μM)	0,4 μM	0,8
RV (10μM)	0,4 μM	0,8
KapaTaq πολυμεράση (5U/μl)	1U ανά 50μl	0,08

Πίνακας 7. Αντίδραση PCR

Αρχική αποδιάταξη	95°C, 2'	Επανάληψη για 33 κύκλους
Αποδιάταξη	95°C, 30''	
Υβριδοποίηση	Tm-5, 30''	
Επιμήκυνση	72°C, 1'/kb	
Τελική επιμήκυνση	72°C, 2'	

Πίνακας 8. Συνθήκες επώασης της αντίδρασης PCR

- Η θερμοκρασία υβριδοποίησης υπολογίστηκε μέσω του online εργαλείου Tm calculator της Thermo Fisher με βάση την πολυμεράση που χρησιμοποιείται και τη συγκέντρωση των

εκκινητών στην αντίδραση. (<https://www.thermofisher.com/gr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>)

Επαλήθευση αποικιών με τη μέθοδο της colony PCR

Η colony PCR μοιράζεται την ίδια αρχή και πειραματική διαδικασία με την απλή PCR με δύο διαφορές στο πρωτόκολλο. Πρώτον, αντί να χρησιμοποιηθεί απομονωμένο DNA ως μήτρα από μια αποικία, χρησιμοποιείται ως μήτρα η ίδια η αποικία. Δεύτερον, για να απελευθερωθεί στο περιβάλλον το DNA, αυξάνεται ο χρόνος του αρχικού βήματος αποδιάταξης σε 7 λεπτά.

Όπως και στην περίπτωση της PCR, η colony PCR χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των επιθυμητών πλασμιδιακών φορέων.

Εκκινητής	Αλληλουχία 5' → 3'
hCas9 2f	tttggtctcaACTCCCTGGAACCTCGAG
hCas9 2r	tttggtctcaTTGAAATAGTCcTCTTTGAGC

Πίνακας 9. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της colony PCR

- Με πεζά γράμματα αντιπροσωπεύονται τα νουκλεοτίδια που δεν είναι συμπληρωματικά και προεξέχουν. Το νουκλεοτίδιο στο μέσο της αλληλουχίας του hCas9 2r που είναι γραμμένο ως “c” αντιπροσωπεύει μια αναντιστοιχία (mismatch). Η παρουσία τους εξυπηρετεί τον σκοπό άλλης εργασίας.

Διαδικασία

Όλοι οι χειρισμοί γίνονται σε πάγο.

1. Σε σωληνάρια της PCR προστίθενται τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση	Τελικός όγκος αντίδρασης 20μl
Αποστειρωμένο ddH ₂ O	-	15,92
Ρυθμιστικό διάλυμα KapaTaq 10X με ιόντα Mg ²⁺	1X	2
dNTPs (10mM)	200μM	0,4
FWD (10μM)	0,4 μM	0,8
RV (10μM)	0,4 μM	0,8
KapaTaq πολυμεράση (5U/μl)	1U ανά 50μl	0,08

Πίνακας 10. Αντίδραση colony PCR

2. Για την προσθήκη της μήτρας (template) ισχύουν τα εξής:

- Προσθήκη ελάχιστης ποσότητας (έως 5ng) από απομονωμένο πλασμίδιο ως θετικό control.
- Μεταφορά ελάχιστης ποσότητας κάθε αποικίας από το πρωταρχικό τρυβλίο σε νέο με το ίδιο αντιβιοτικό (ίδιας συγκέντρωσης) με αποστειρωμένο tip. Στη συνέχεια, το ίδιο tip τοποθετείται στο εσωτερικό του σωληναρίου της PCR, στο οποίο ήδη υπάρχουν τα υπόλοιπα συστατικά της PCR, και ακολουθεί ανάδευση για να απελευθερωθούν τα κύτταρα της αποικίας από το tip.
- Το tip ίσα που να αγγίζει την αποικία, αλλιώς η υπερβολική ποσότητα κυττάρων θα δράσει ανασταλτικά στην αντίδραση.


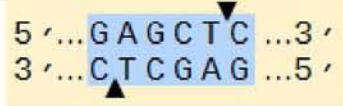
Αρχική αποδιάταξη	95°C, 7'	Επανάληψη για 33 κύκλους
Αποδιάταξη	95°C, 30''	
Υβριδοποίηση	Tm-5, 30''	
Επιμήκυνση	72°C, 1'/kb	
Τελική επιμήκυνση	72°C, 2'	

Πίνακας 11. Συνθήκες επώασης της colony PCR

- Η θερμοκρασία υβριδοποίησης υπολογίστηκε μέσω του online εργαλείου Tm calculator της ThermoFisher.

Πένψη πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού είναι ένζυμα που παράγονται από βακτήρια. Χαρακτηρίζονται ως "ενδονουκλεάσες", διότι κόβουν το DNA στο εσωτερικό του μορίου. Στο εργαστήριο χρησιμοποιούνται, μεταξύ άλλων, για την ταυτοποίηση μορίων DNA, καθώς αναγνωρίζουν και κόβουν συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες αφήνοντας τμήματα προβλεπόμενου αριθμού και μεγέθους.

Ένζυμα περιορισμού	Αλληλουχία αναγνώρισης και κοπής	Πλασμιδιακός φορέας που κόβεται	Αριθμός θέσεων κοπής
ECORV		attL1-hCas9-attL2 φορέας	2
SacI		pUB500i-hCas9 φορέας	2

Πίνακας 12. Ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των πλασμιδίων

Διαδικασία πένψης

1. Προσθήκη των παρακάτω συστατικών σε σωλήνα τύπου eppendorf των 1.5ml:

Αντιδραστήρια	Τελικός όγκος αντίδρασης 50μl
Πλασμιδιακός φορέας	έως 1μg
Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου 10x	5μl (1x)
Ένζυμο περιορισμού	10U
Αποστειρωμένο ddH ₂ O	μέχρι τα 50μl

Πίνακας 13. Αντίδραση πέψης

- Χρήση του NEBuffer 3.1 και CutSmartBuffer για το ECORV και SacI αντίστοιχα.
- 2. Ακολουθεί καλή ανάμειξη με πιπετάρισμα
- 3. Επώαση των δειγμάτων στους 37°C για 1 ώρα. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο ή φυλλάσσονται στο ψυγείο ή την κατάψυξη για μελλοντική χρήση.
- 4. Η ανίχνευση των τμημάτων που προκύπτουν μετά από την πέψη γίνεται μέσω ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης.

Ανάλυση τμημάτων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Για την ταυτοποίηση του μεγέθους ενός πλασμιδιακού φορέα ή οποιουδήποτε τμήματος DNA, είτε αυτό προέρχεται από πέψη με ένζυμο περιορισμού, είτε από ενίσχυση μέσω PCR (ή κάποια άλλη αντίδραση), είναι απαραίτητη η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε κάποιο πήκτωμα, στην περίπτωση μας πήκτωμα αγαρόζης. Αυτή οδηγεί στο διαχωρισμό των μορίων με βάση το μέγεθος και τη διαμόρφωσή τους (γραμμικό, υπερελικωμένο κλπ).

Υλικά

- **Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 50X TAE:**

24,2%(w/v) Tris,
57,1 ml/lit οξικό οξύ,
100 ml/lit 0.5 M EDTA ,
με pH διαλύματος 8,5

- **Βρωμιούχο αιθίδιο**

- **Διάλυμα 6X Loading Buffer:**

Διαδικασία

Αρχικά, πρέπει να φτιαχτεί το πήκτωμα αγαρόζης. Ανάλογα το μέγεθος των τμημάτων DNA που θέλουμε να διαχωρίσουμε και τη διακριτική ικανότητα που θέλουμε να επιτύχουμε παρασκευάζουμε διάλυμα πηκτής αγαρόζης κατάλληλης συγκέντρωσης. Στην περίπτωση μας αρκούσε διάλυμα TAE 1% αγαρόζης. Προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE 1X (Tris Acetate Acid/EDTA). Αφού διαλυτοποιήθηκε η αγαρόζη μέσω θέρμανσης, προστέθηκε το βρωμιούχο αιθίδιο. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε κατάλληλο εκμαγείο και τοποθετήθηκε η χτένα. Μετά την πήξη του, αφαιρέθηκε η χτένα και αποκαλύφθηκαν οι θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων (πηγαδάκια).

Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε το πήκτωμα σε συσκευή ηλεκτροφόρησης. Ο υπόλοιπος χώρος καλύφθηκε με διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE 1X. Εφόσον τα δείγματα φορτώθηκαν στα πηγαδάκια, εφαρμόστηκε κατάλληλο ηλεκτρικό πεδίο 100-130 Volt για 30-60 λεπτά, ώστε να διαχωριστούν καλά οι ζώνες.

- Πριν τη φόρτωση των δειγμάτων η ποσότητα DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί αναμείχθηκε με ποσότητα του loading buffer σε τελική συγκέντρωση 1X.
- Μαζί με τα δείγματα φορτώθηκε και μικρή ποσότητα (3μl) ενός μάρτυρα γνωστού μεγέθους (1kb DNA ladder).

Παρασκευή θρεπτικού υλικού για την ανάπτυξη βακτηρίων

- **Luria Broth (LB):** θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των *E. coli*

0,5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης

1%(w/v) NaCl

1% (w/v) πεπτόνη

Αφού αποστειρωθεί, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη υγρών βακτηριακών καλλιεργειών με το κατάλληλο αντιβιοτικό ή να χρησιμοποιηθεί κατά τον μετασχηματισμό βακτηρίων. Στην περίπτωση της ανάπτυξης στερεών καλλιεργειών σε τρυβλία, αρκεί η προσθήκη άγαρ 1,5% (w/v) πριν την αποστείρωση. Για να δημιουργηθεί το στερεό υπόστρωμα απαιτείται λιώσιμο του θρεπτικού, σύντομη ψύξη για να μειωθεί η θερμοκρασία και προσθήκη του αντιβιοτικού. Ακολούθως, το μείγμα χύνεται στα τρυβλία και στερεοποιείται.

Χρήση αντιβιοτικών για την επιλογή βακτηρίων με το επιθυμητό πλασμίδιο

Στο πλαίσιο των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιβιοτικά για την ανάπτυξη των επιθυμητών μετασχηματισμένων βακτηριακών στελεχών.

Αντιβιοτικά	Συγκέντρωση Stock	Τελική συγκέντρωση	Μετασχηματισμένο βακτηριακό στέλεχος
Γενταμυκίνη (Gentamycin)	50mg/ml	10μg/ml	DB3.1 με το pDONR™207
			DH5a με το attL1-hCas9-attL2
Σπεκτινομυκίνη (Spectinomycin)	100 mg/ml	100μg/ml	DH5a με το pK7WGF2::hCas9
Καναμυκίνη (Kanamycin)	50mg/ml	50μg/ml	DH5a με το pUB-GWS-Hyg
			DH5a με το pUB500i-hCas9
Καρμπενικιλίνη (Carbenicillin)	100 mg/ml	100μg/ml	DH5a με το p::sgRNA1 και p::sgRNA2

Πίνακας 14. Χρήση αντιβιοτικών ανάλογα με το φορέα

Αποθήκευση βακτηρίων σε γλυκερόλη για μεγάλα χρονικά διαστήματα

Η διατήρηση μιας αποικίας σε τρυβλίο ή υγρή καλλιέργεια γίνεται για περιορισμένο χρόνο. Μπορεί να αποθηκευτεί για μεγάλο χρονικό διάστημα (μήνες) με την παρασκευή ενός βακτηριακού stock γλυκερόλης.

Διαδικασία

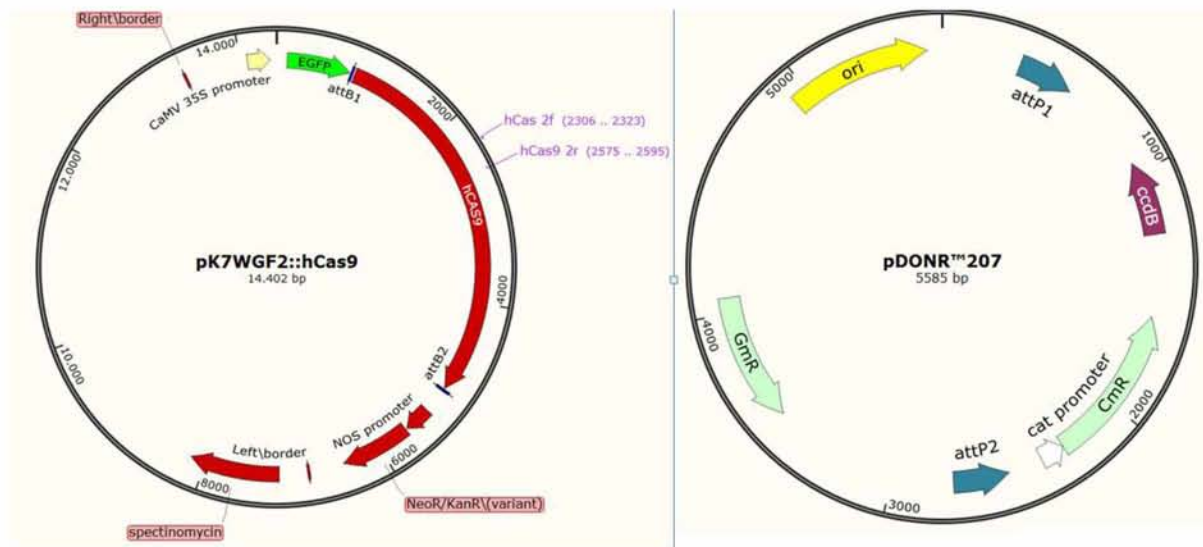
1. Μονή αποικία βακτηριακού στελέχους, που πρόκειται να αποθηκευτεί, αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB παρουσία κατάλληλης συγκέντρωσης αντιβιοτικού στους 37°C για 16-18 ώρες υπό ανάδευση στα 210rpm.
 - Το θρεπτικό μέσο έχει ήδη αποστειρωθεί, ενώ η προσθήκη του αντιβιοτικού και της αποικίας/ποσότητας υγρής καλλιέργειας γίνεται κάτω από στείρες συνθήκες, πχ κοντά σε φλόγα.
2. 700μl από την καλλιέργεια αυτή μεταφέρονται σε αποστειρωμένο φιαλίδιο eppendorf.
3. Προστίθενται 300μl αποστειρωμένης γλυκερόλης 99%.
4. Το μείγμα αναμιγνύεται πολύ καλά και ψύχεται σε υγρό άζωτο.
5. Αποθήκευση στους -80°C.

Το πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε για την αποθήκευση των παρακάτω βακτηρίων:

- Μετασχηματισμένα στελέχη DH5α με το attL1-hCas9-attL2 της αποικίας 1 και 5 της αντίδρασης ανασυνδυασμού BP
- Μετασχηματισμένα στελέχη DH5α με το pUB500i-hCas9 της αποικίας 1 και 2 της αντίδρασης ανασυνδυασμού LR

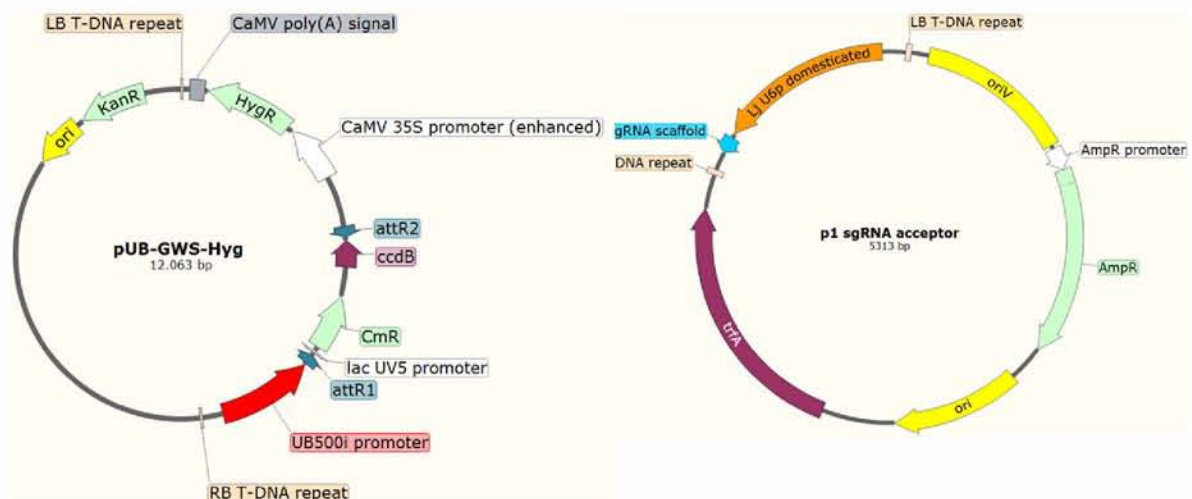
Παράρτημα

Α. Χάρτες πλασμιδιακών φορέων



pKWGF72::hCas9: Φορέας του γονιδίου της hCas9 υπό την επίδραση του υποκινητή CaMV 35S για την έκφραση της ενδονουκλεάσης σε φυτικό ιστό. Στο γονίδιο της Cas9 έχουν γίνει κάποιες μετατροπές στα κωδικόνια για τη βέλτιστη έκφραση σε ανθρώπινα κύτταρα (codon optimization). Ωστόσο, βρέθηκε ότι εκφράζεται σε ικανοποιητικά επίπεδα και στα φυτά (Zhang et al. 2016). Περιβάλλεται από τις θέσεις ανασυνδυασμού attB1 και attB2 που χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία Gateway®, ενώ διαθέτει γονίδια ανθεκτικότητας στη σπεκτινομυκίνη και στην καναμυκίνη. Με μωβ φαίνονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την colony PCR.

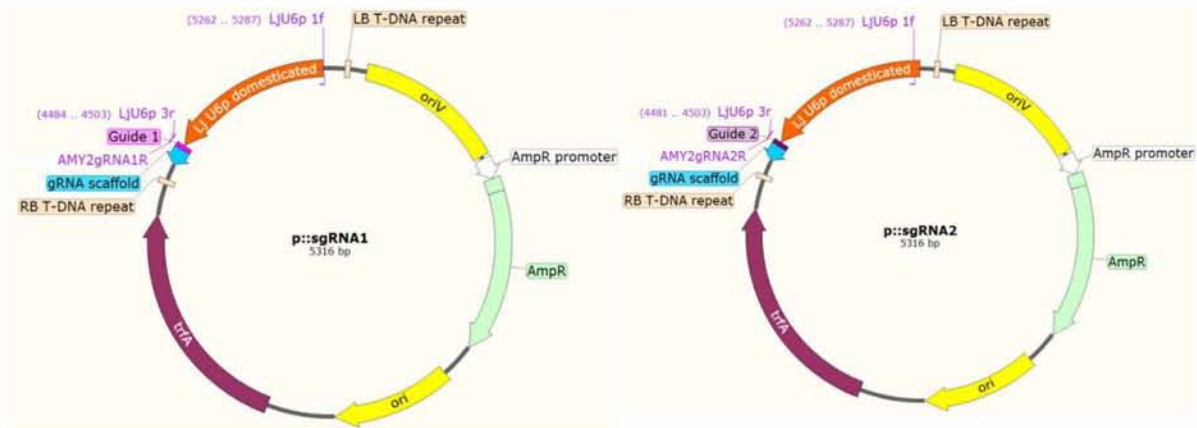
pDONR™207: Φορέας των θέσεων ανασυνδυασμού attP. Ο σκελετός του φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στη γενταμυκίνη.



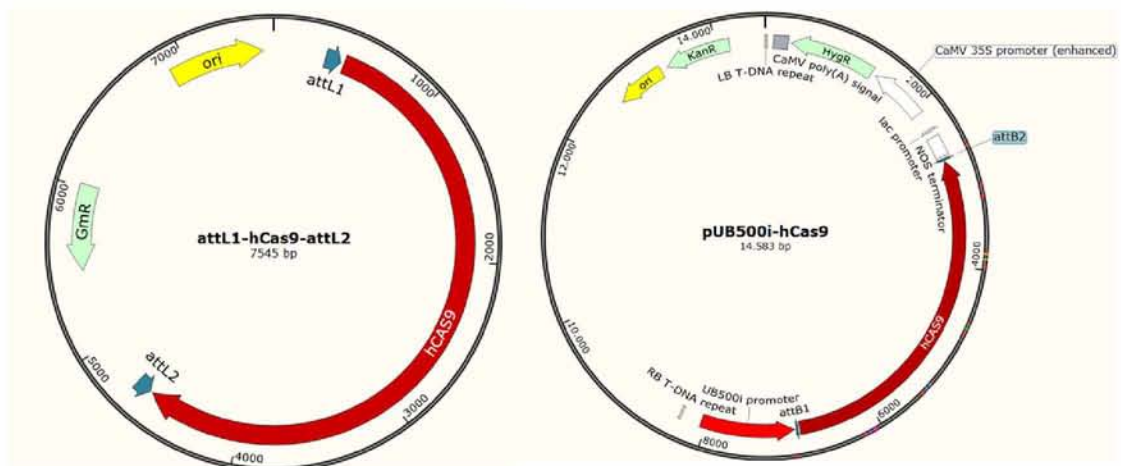
pUB-GWS-Hyg: Κατασκευάστηκε από τους Maekawa et al 2007. Περιέχει μια τροποποιημένη μορφή του υποκινητή του γονιδίου *LjUBQ1*, τον *pUB500i*, που φέρει το μοναδικό ιντρόνιο του γονιδίου της ουβικουτίνης. Καθοδικά του υπάρχει η κασέτα *attR1-ccdB-attR2* για την ένθεση οποιουδήποτε γονιδίου και την έκφραση του υπό τον υποκινητή *pUB500i*. Ο σκελετός του φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη.

p1 sgRNA acceptor: Κατασκευάστηκε στο εργαστήριο μας. Ο σκελετός προέρχεται από το φορέα *pICH47732*. Μέσω της τεχνολογίας Golden Gate ενσωματώθηκε ο υποκινητής *U6* του φυτού *Lotus japonicus* και το gRNA scaffold του συστήματος CRISPR/Cas9 του οργανισμού *Streptococcus pyogenes*. Φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην καρμπενικιλίνη.

B. Χάρτες ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών φορέων



Ανασυνδυασμένοι φορείς p::sgRNA1 και p::sgRNA2. Με μωβ φαίνονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη PCR.



Ανασυνδυασμένοι φορείς της hCas9. Ο pUB500i-hCas9 είναι ο τελικός επιθυμητός φορέας.

Βιβλιογραφία

- Abe, Ikuro. 2007. "Enzymatic Synthesis of Cyclic Triterpenes." *Natural Product Reports* 24(6):1311–31.
- Al-Attar, Sinan, Edze R. Westra, John Van Der Oost, and Stan J. J. Brouns. 2011. "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPRs): The Hallmark of an Ingenious Antiviral Defense Mechanism in Prokaryotes." *Biological Chemistry* 392(4):277–89.
- Barrangou, Rodolphe, Christophe Fermaux, Hélène Devau, Melissa Richards, Patrick Boyaval, Sylvain Moineau, Dennis a Romero, and Philippe Horvath. 2007. "CRISPR Provides Acquired Resistance against Viruses in Prokaryotes." *Science (New York, N.Y.)* 315(March):1709–12.
- Bennett, Richard N., Roger M. Wallsgrove, N. Bennett, and M. Wallsgrove. 1994. "Tansley Secondary Review Metabolites in Plant Defence Mechanisms." *New Phytologist* 127(72):617–33.
- Bhaya, Devaki, Michelle Davison, and Rodolphe Barrangou. 2011. "CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation." *Annual Review of Genetics* 45(1):273–97.
- Bolotin, Alexander, Benoit Quinquis, Alexei Sorokin, and S. Dusko Ehrlich. 2005. "Clustered Regularly Interspaced Short Palindrome Repeats (CRISPRs) Have Spacers of Extrachromosomal Origin." *Microbiology* 151(8):2551–61.
- Bortesi, Luisa and Rainer Fischer. 2015. "The CRISPR/Cas9 System for Plant Genome Editing and Beyond." *Biotechnology Advances* 33(1):41–52.
- Brasch, Michael A., James L. Hartley, and Gary F. Temple. 2000. "DNA Cloning Using In Vitro Site-Specific Recombination." *Genome Research* 10(11):1788–95.
- Christian, Michelle, Tomas Cermak, Erin L. Doyle, Clarice Schmidt, Feng Zhang, Aaron Hummel, Adam J. Bogdanove, and Daniel F. Voytas. 2010. "Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases." *Genetics* 186(2):756–61.
- Confalonieri, Massimo, Maria Cammareri, Elisa Biazzi, Paola Pecchia, Manuel Pedro Salema Fevereiro, Alma Balestrazzi, Aldo Tava, and Clara Conicella. 2009. "Enhanced Triterpene Saponin Biosynthesis and Root Nodulation in Transgenic Barrel Medic (Medicago Truncatula Gaertn.) Expressing a Novel β -Amyrin Synthase (AsOXA1) Gene." *Plant Biotechnology Journal* 7(2):172–82.
- Delis, Costas, Afrodite Krokida, Sofia Georgiou, Nektarios Kavroulakis, Luis M. Peña-Rodríguez, Efsthathia Ioannou, Vassilios Roussis, Anne E. Osbourn, and Kalliope K. Papadopoulou. 2011. "Role of Lupeol Synthase in Lotus Japonicus Nodule Formation." *New Phytologist* (2010):335–46.
- Eschenmoser, Albert and Duilio Arigoni. 2005. "Revisited after 50 Years: The 'Stereochemical Interpretation of the Biogenetic Isoprene Rule for the Triterpenes.'" *Helvetica Chimica Acta* 88(12):3011–50.
- Fukai, Eigo, Jens Stougaard, and Makoto Hayashi. 2013. "Activation of an Endogenous Retrotransposon Associated with Epigenetic Changes in : A Tool for Functional Genomics in Legumes." *The Plant Genome* 6(3):0.
- Gasiunas, G., R. Barrangou, P. Horvath, and V. Siksnys. 2012. "Cas9-CrRNA Ribonucleoprotein Complex

- Mediates Specific DNA Cleavage for Adaptive Immunity in Bacteria.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(39):E2579–86.
- Haralampidis, K., G. Bryan, X. Qi, K. Papadopoulou, S. Bakht, R. Melton, and A. Osbourn. 2001. “A New Class of Oxidosqualene Cyclases Directs Synthesis of Antimicrobial Phytoprotectants in Monocots.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(23):13431–36.
- Haralampidis, Kosmas, Miranda Trojanowska, and Anne E. Osbourn. 2002. “Biosynthesis of Triterpenoid Saponins in Plants.” 75:31–49.
- Hill, Robert A. and Joseph D. Connolly. 2018. “Triterpenoids.” *Natural Product Reports* 35(12):1294–1329.
- Hsu, Patrick D., David A. Scott, Joshua A. Weinstein, F. Ann Ran, Silvana Konermann, Vineeta Agarwala, Yinqing Li, Eli J. Fine, Xuebing Wu, Ophir Shalem, Thomas J. Cradick, Luciano A. Marraffini, Gang Bao, and Feng Zhang. 2013. “DNA Targeting Specificity of RNA-Guided Cas9 Nucleases.” *Nature Biotechnology* 31(9):827–32.
- Husselstein-Muller, Tania, Hubert Schaller, and Pierre Benveniste. 2001. “Molecular Cloning and Expression in Yeast of 2,3-Oxidosqualene-Triterpenoid Cyclases from *Arabidopsis thaliana*.” *Plant Molecular Biology* 45(1):75–92.
- Ishino, Y., H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, and A. Nakamura. 1987. “Nucleotide Sequence of the *lap* Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isoenzyme Conversion in *Escherichia coli*, and Identification of the Gene Product.” *Journal of Bacteriology* 169(12):5429–33.
- Iturbe-Ormaetxe, Iñaki, Kosmas Haralampidis, Kalliopi Papadopoulou, and Anne E. Osbourn. 2003. “Molecular Cloning and Characterization of Triterpene Synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*.” *Plant Molecular Biology* 51(5):731–43.
- Jansen, Ruud, Jan D. A. Van Embden, Wim Gaastra, and Leo M. Schouls. 2002. “Jansen_Identification of Genes That Are Associated with DNA Repeats in Prokaryotes.Pdf.” 43:1565–75.
- Jinek, Martin, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A. Doudna, and Emmanuelle Charpentier. 2012. “A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity.” 337(August):816–22.
- Katzen, Federico. 2007. “Gateway® Recombinational Cloning: A Biological Operating System.” *Expert Opinion on Drug Discovery* 2(4):571–89.
- Kemen, A. C., S. Honkanen, R. E. Melton, K. C. Findlay, S. T. Mugford, K. Hayashi, K. Haralampidis, S. J. Rosser, and A. Osbourn. 2014. “Investigation of Triterpene Synthesis and Regulation in Oats Reveals a Role for -Amyrin in Determining Root Epidermal Cell Patterning.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(23):8679–84.
- Kim, Y. G., J. Cha, and S. Chandrasegaran. 1996. “Hybrid Restriction Enzymes: Zinc Finger Fusions to Fok I Cleavage Domain.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(3):1156–60.
- Krokida, Afrodite, Costas Delis, Katrin Geisler, Constantine Garagounis, Daniela Tsikou, Luis M. Peña-Rodríguez, Dimitra Katsarou, Ben Field, Anne E. Osbourn, and Kalliope K. Papadopoulou. 2013. “A Metabolic Gene Cluster in *Lotus japonicus* Discloses Novel Enzyme Functions and Products in Triterpene Biosynthesis.” *New Phytologist* 200(3):675–90.

- Kumar, Vinay and Mukesh Jain. 2015. "The CRISPR – Cas System for Plant Genome Editing : Advances and Opportunities." 66(1):47–57.
- Landy, Arthur. 1989. "Dynamic, Structural and Regulatory Aspects of λ Site-Specific Recombination."
- Laszczyk, Melanie N. 2009. "Pentacyclic Triterpenes of the Lupane, Oleanane and Ursane Group as Tools in Cancer Therapy." *Planta Medica* 75(15):1549–60.
- Li, Jun Meng, Xiangbing, Jiayang Li, and Caixia Gao. 2019. "Gene Replacement by Intron Targeting with CRISPR-Cas9." *Methods in Molecular Biology* 1917:285–96.
- Maekawa, Takaki, Mitsumasa Kusakabe, Yoshikazu Shimoda, Shusei Sato, Satoshi Tabata, Yoshikatsu Murooka, and Makoto Hayashi. 2008. " Polyubiquitin Promoter-Based Binary Vectors for Overexpression and Gene Silencing in Lotus Japonicus ." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21(4):375–82.
- Makarova, Kira S., L. Aravind, Yuri I. Wolf, and Eugene V. Koonin. 2011. "Unification of Cas Protein Families and a Simple Scenario for the Origin and Evolution of CRISPR-Cas Systems." *Biology Direct* 6(1):38.
- Makarova, Kira S., Yuri I. Wolf, Omer S. Alkhnbashi, Fabrizio Costa, Shiraz A. Shah, Sita J. Saunders, Rodolphe Barrangou, Stan J. J. Brouns, Emmanuelle Charpentier, Daniel H. Haft, Philippe Horvath, Sylvain Moineau, Francisco J. M. Mojica, M. Rebecca, Michael P. Terns, Malcolm F. White, Alexander F. Yakunin, and Roger A. Garrett. 2017. "2015 CRISPR Review." 13(11):722–36.
- Malolepszy, Anna, Terry Mun, Niels Sandal, Vikas Gupta, Manu Dubin, Dorian Urbański, Niraj Shah, Asger Bachmann, Eigo Fukai, Hideki Hirakawa, Satoshi Tabata, Marcin Nadziejka, Katharina Markmann, Junyi Su, Yosuke Umehara, Takashi Soyano, Akira Miyahara, Shusei Sato, Makoto Hayashi, Jens Stougaard, and Stig U. Andersen. 2016. "The LORE1 Insertion Mutant Resource." *Plant Journal* 88(2):306–17.
- Mojica, Francisco J. M., César Díez-Villaseñor, Jesús García-Martínez, and Elena Soria. 2005. "Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements." *Journal of Molecular Evolution* 60(2):174–82.
- Morita, Masayo, Masaaki Shibuya, Tetsuo Kushiro, Kazuo Masuda, and Yutaka Ebizuka. 2000. "Molecular Cloning and Functional Expression of Triterpene Synthases from Pea (*Pisum Sativum*)." *European Journal of Biochemistry* 267(12):3453–60.
- Moses, Tessa, Jacob Pollier, Johan M. Thevelein, and Alain Goossens. 2013. "GoossensRevNewPhyt." 27–43.
- Osborn, Anne. 2010. "Secondary Metabolic Gene Clusters: Evolutionary Toolkits for Chemical Innovation." *Trends in Genetics* 26(10):449–57.
- Papadopoulou, K., R. E. Melton, M. Leggett, M. J. Daniels, and A. E. Osborn. 1999. "Compromised Disease Resistance in Saponin-Deficient Plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(22):12923–28.
- Phillips, Dereth R., Jeanne M. Rasbery, Bonnie Bartel, and Seiichi PT Matsuda. 2006. "Biosynthetic Diversity in Plant Triterpene Cyclization." *Current Opinion in Plant Biology* 9(3):305–14.
- Pourcel, C., G. Salvignol, and Gilles Vergnaud. 2005. "CRISPR Elements in *Yersinia Pestis* Acquire New Repeats by Preferential Uptake of Bacteriophage DNA, and Provide Additional Tools for Evolutionary Studies." *Microbiology* 151(3):653–63.
- Qi, X., S. Bakht, M. Leggett, C. Maxwell, R. Melton, and A. Osborn. 2004. "A Gene Cluster for Secondary Metabolism in Oat: Implications for the Evolution of Metabolic Diversity in Plants." *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America 101(21):8233–38.

Salmon, Melissa, Ramesha B. Thimmappa, Robert E. Minto, Rachel E. Melton, Richard K. Hughes, Paul E. O'Maille, Andrew M. Hemmings, and Anne Osbourn. 2016. "A Conserved Amino Acid Residue Critical for Product and Substrate Specificity in Plant Triterpene Synthases." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(30):E4407–14.

Sato, S., Y. Nakamura, T. Kaneko, E. Asamizu, T. Kato, M. Nakao, S. Sasamoto, A. Watanabe, A. Ono, K. Kawashima, T. Fujishiro, M. Katoh, M. Kohara, Y. Kishida, C. Minami, S. Nakayama, N. Nakazaki, Y. Shimizu, S. Shinpo, C. Takahashi, T. Wada, M. Yamada, N. Ohmido, M. Hayashi, K. Fukui, T. Baba, T. Nakamichi, H. Mori, and S. Tabata. 2008. "Genome Structure of the Legume." *Lotus Japonicus DNA Res* 15:227–39.

Sawai, Satoru, Tamotsu Shindo, Shusei Sato, Takakazu Kaneko, Satoshi Tabata, Shin Ichi Ayabe, and Toshio Aoki. 2006. "Functional and Structural Analysis of Genes Encoding Oxidosqualene Cyclases of *Lotus Japonicus*." *Plant Science* 170(2):247–57.

Schulman, Alan H. 2013. "Retrotransposon Replication in Plants." *Current Opinion in Virology* 2:1–11.

Sontheimer, Erik J. and Luciano A. Marraffini. 2010. "CRISPR Interference: RNA-Directed Adaptive Immunity in Bacteria and Archaea." *Nature Reviews. Genetics* 11(3):181–90.

Swarts, Daan C., Cas Mosterd, Mark W. J. van Passel, and Stan J. J. Brouns. 2012. "CRISPR Interference Directs Strand Specific Spacer Acquisition." *PLoS ONE* 7(4):1–7.

Thimmappa, Ramesha, Katrin Geisler, Thomas Louveau, Paul O'Maille, and Anne Osbourn. 2014. "Triterpene Biosynthesis in Plants." *Annual Review of Plant Biology* 65(1):225–57.

Udvardi, Michael K. and David A. Day. 2002. "Metabolite Transport Across Symbiotic Membranes of Legume Nodules." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48(1):493–523.

Wendt, K. Ulrich. 2005. "Enzyme Mechanisms for Triterpene Cyclization: New Pieces of the Puzzle." *Angewandte Chemie - International Edition* 44(26):3966–71.

Xu, Ran, Gia C. Fazio, and Seichi P. T. Matsuda. 2004. "On the Origins of Triterpenoid Skeletal Diversity." *Phytochemistry* 65(3):261–91.

Zhang, Bin, Xia Yang, Chunping Yang, Mingyang Li, and Yulong Guo. 2016. "Exploiting the CRISPR/Cas9 System for Targeted Genome Mutagenesis in *Petunia*." *Scientific Reports* 6(February):1–8.

Zhang, Feng, Yan Wen, and Xiong Guo. 2014. "CRISPR/Cas9 for Genome Editing: Progress, Implications and Challenges." *Human Molecular Genetics* 23(R1):40–46.

Zhang, Xiao Hui, Louis Y. Tee, Xiao Gang Wang, Qun Shan Huang, and Shi Hua Yang. 2015. "Off-Target Effects in CRISPR/Cas9-Mediated Genome Engineering." *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 4(11):e264.